



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK KÜTÜPHANESİ

**TİP 1 DİYABETLİ TÜRK ÇOCUKLARINDA
CTLA-4
GEN POLİMORFİZMİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fatih ÇELMELİ

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Sema AKÇURİN

“ Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir ”

ANTALYA, 2005

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sema Akçurin'e ve Sayın Prof. Dr. Olcay Yeğin'e, immünoloji laboratuvarı çalışanlarına, uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığımız tüm öğretim üyeleri ile asistan arkadaşlarıma ve her zaman büyük destek gördüğüm aileme sonsuz teşekkürler....

İÇİNDEKİLER

Sayfa no:

Çizelgeler ve Şekiller Dizini.....	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Tanım ve sınıflama.....	4
2.3. Tip 1 _A DM	7
2.3.1. Epidemiyoloji.....	8
2.3.2. Etyoloji ve Patogenez.....	9
2.4. Sitotoksik T hücresi ile ilişkili antijen 4 (CTLA-4).....	15
3. OLGULAR VE METOD.....	17
3.1. Olgular.....	17
3.2. DNA İzolasyonu.....	17
3.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	18
3.4. Bbv1 Restriksiyon Enzimi ile Kesim.....	20
3.5. İstatistiksel Analiz.....	23
4. SONUÇLAR.....	24
5. TARTIŞMA.....	27
6. KAYNAKLAR.....	31

ÇİZELGELER VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Çizelge 1: Diyabetes mellitusta tanı kriterleri.....	4
Çizelge 2: Diyabetes mellitus etyolojik sınıflaması.....	5
Çizelge 3: Tip 1 diyabet ve kontrol grubunun genotip ve allel dağılımı.....	25
Çizelge 4: Tip 1 diyabetli olguların klinik ve laboratuar özelliklerinin genotip ve allel dağılımına göre irdelenmesi.....	26
Şekil 1. Bbv1 enzimi ile yabancı tip, heterozigot ve homozigot mutant bireyler için beklenen fragment büyüklükleri.....	22

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetes mellitus (DM) insülin salgılanmasında ya da etkisinde yetersizlik sonucu gelişen karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozukluğudur. Morbiditesi ve mortalitesi yüksek, kronik seyirli bir hastalık olan tip 1 DM çocukluk ve adölesan çağının en sık görülen endokrin-metabolizma hastalığıdır (1-8). Pankreas adacık β hücrelerinin otoimmün süreç sonucu yıkımı ve gelişen insülin eksikliği tip 1 DM'un patogenezinin sorumludur. Tip 1 DM'un karmaşık etyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, genetik olarak eğilimli bireylerde bazı çevresel faktörlerin tetikleyici etkisiyle ortaya çıktığı bilinmektedir. Genom taramaları ve aday genler üzerindeki çalışmalar polimorfik DNA belirteçleri ile tip 1 DM'a duyarlılık oluşturduğu farzedilen 15'den fazla lokus arasında genetik bir bağlantı olduğuna işaret etmektedir (8,9). İkinci kromozomda bulunan sitotoksik T hücresi ilişkili antijen-4 (CTLA-4) geni de aday genler arasındadır. T hücresinde sentez edilen ve hücre yüzeyinde gösterildiğinde aktive olmuş T hücrelerinin aktivasyonunu inhibe eden ve onları apoptoza yönlendiren bir ko-stimülatör (eş-uyaran) olan CTLA-4 molekülünde fonksiyonel ve/veya şekilsel değişiklik yaratacak genetik farklılıklar T hücre aktivasyonunun inhibe edilememesine ve otoimmün hastalıkların gelişmesine sebep olabilmektedir (10-16).

DNA polimorfizmi, DNA üzerinde hastalığa neden olmayan suskun nükleotid değişimleri olarak tanımlanır. Bir genin promotor dizinindeki polimorfizm anormal transkripsiyon düzenlenmesine neden olarak, hastalığın ortaya çıkmasına veya şiddetinin değişmesine

katkıda bulunabilir. (17,18). CTLA-4 geninde 3 polimorfik bölge bilinmektedir. Bunlardan CTLA-4 ekzon 1 kodon 49 A/G polimorfizmi ile tip 1 DM birlikteliği, çalışılan çeşitli etnik gruplarda sabit bir fenomen olarak görünmekte ve homozigot yapının klinik fenotipi etkileyebildiği gözlenmektedir(12). Bu çalışma, Türk toplumunda daha önce araştırılmamış olan CTLA-4 ekzon 1 kodon 49 A/G polimorfizminin, tip 1 DM'li Türk çocuklarından oluşan çalışma grubumuzda bu otoimmün hastalığın gelişimi açısından risk faktörü oluşturup oluşturmadığını ve G allel taşıyıcılığı ile hastaların klinik özelliklerinin arasında ilişki olup olmadığını belirlemeye yönelik amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe:

Diyabet ile ilgili en eski kayıtlar milattan önce 1550'li yıllarda Mısır'da yazılmış bir papirüste bulunmuştur. Bu papirüste, şeker hastalığına benzer, çok idrara çıkma ile seyreden bir durumdan bahsedilmektedir. Hindularda, Ayur Veda'da böcek, sinek ve karıncaların bazı insanların idrarına toplandığını kaydedilmiştir. Susruta ve diğer Hintli doktorlar M.S 5-6. yüzyılda bu hastalığın iki formu olduğunu yazmışlardır. Bir formunda hastalar zayıf ve çok uzun yaşamadan kısa sürede ölmekte, diğer grupta ise hastalar şişman ve daha yaşlı olarak belirtilmiştir. Bu, günümüzün modern sınıflamasında belirtilen Tip 1 ve Tip 2 DM sınıflamasına çok benzemektedir. Willis antidiüretik hormon eksikliği sonucu ortaya çıkan diyabetes insipidus ile diyabetes mellitusun ayırımını yapmıştır. Berlin'den Paul Langerhans 1869 yılında verdiği doktora tezinde pankreas bezi içindeki küçük hücre topluluklarını göstermiştir. Kanada Toronto Üniversitesi'nden Fredirick G. Banting, asistanı Charles H. Best, biyokimyacı James B. Collip ve fizyolog J.J.R. Macleod'un ortak çalışmaları sonucu insülinin 1921 yılında izole edilmesi ile önemli bir gelişme gerçekleşmiştir. İlk kez 1 Ocak 1922 tarihinde diyabetik bir hasta olan Leonard Thompson üzerinde denenmiş ve başarılı sonuç vererek ölümcül bir hastalık olan şeker hastalığı tedavi edilmiştir. Cambridge'den bilim adamı Frederick Sanger, 1955 yılında insülinin iki aminoasit zinciri yapısında olduğunu göstererek 1955 yılında Nobel ödülünü almış, Dorothy

Hodgkin 1969 yılında insülinin 3 boyutlu yapısını ortaya koyarak Nobel ödülü kazanan bir başka bilim insanı olmuştur (19).

2.2. Tanım ve sınıflama

1997'de Amerikan Diyabet Derneği (ADA) ve 1999'da Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) kriterlerine göre normal açlık (8 saatlik) plazma glukozu 110 mg/dl (6,1 mmol/L) altındadır. Açlık plazma glukozu ve glukoz tolerans testi (OGGT) değerlerine göre glukoz intoleransı, bozulmuş açlık glukozu ve diyabetes mellitus tanı kriterleri çizelge 1 de özetlenmiştir (20,21).

Çizelge 1. Diyabetes mellitusta tanı kriterleri:

<u>Tanımlama:</u>	<u>Plazma glukozu:</u>
<i>Açlık değeri</i>	
• Normal	<110 mg/dl
• Bozulmuş açlık glukozu	110-125 mg/dl
• Diyabet	>126 mg/dl
<i>OGGT (2. saat)</i>	
• Normal	< 140 mg/dl
• Bozulmuş glukoz toleransı	140-199 mg/dl
• Diyabet	>200 mg/dl
Diyabet semptomları ile birlikte rasgele değer	
• Diyabet	>200 mg/dl

2000 yılında ADA tarafından yayınlanan diyabetin etyolojik sınıflaması çizelge 2 de verilmiştir (22).

Çizelge 2: Diabetes mellitus etyolojik sınıflaması

- I. **Tip 1 diyabet** (pankreas β hücre hasarına bağlı oluşan insülin eksikliği)
 - a. Otoimmün nedenli Tip 1A
 - b. İdiyopatik Tip 1B
- II. **Tip 2 diyabet** (değişken derecede insülin rezistansı, göreceli insülin eksikliği)
- III. Pankreas β hücre fonksiyonlarının genetik bozuklukları
 - a. MODY (Maturity onset diabetes of young-Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet)
 - b. Mitokondrial DNA mutasyonları
 - c. Wolfram sendromu (DIDMOAD sendromu)
 - d. Tiamine cevaplı DM
- IV. İnsülin etkisindeki genetik defektler
 - a. Tip A insülin rezistansı-akantozis
 - b. Leprechaunism
 - c. Rabson-Mendenhall sendromu
 - d. Lipoatrofik diyabet
- V. Ekzokrin pankreas hastalıkları
 - a. Pankreatitis

- b. Travma / Pankreatektomi
- c. Kistik fibrozis
- d. Hemokromatozis
- e. Neoplaziler

VI. Endokrinopatiler

- a. Akromegali
- b. Cushing hastalığı
- c. Glukagonoma
- d. Feokromositoma
- e. Hipertiroidizm
- f. Somatostatinoma
- g. Aldostrenoma

VII. İlaç ve kimyasal maddelere bağlı

- a. Vacor (rodentisid)
- b. Pentamidin
- c. Nikotinic asit
- d. Glukokortikoidler
- e. Diazoksid
- f. β adrenerjik agonistler
- g. Tiazidler
- h. Dilantin
- i. Siklosporin
- j. Takrolimus
- k. L-asparaginaz

VIII. Enfeksiyonlar

- a. Konjenital rubella
- b. Sitomegalovirus

IX. Nadir formlar

- a. “Stiff-man” sendromu
- b. Anti-insülin reseptör antikorları

X. Genetik sendromlara eşlik eden diyabet

- a. Down sendromu
- b. Turner sendromu
- c. Klinefelter sendromu
- d. Prader-Willi sendromu
- e. Bardet- Biedl sendromu

XI. Gestasyonel diyabet

XII. Neonatal diyabet

- a. Geçici (7-20 yıl sonra tekrarlayan formlar vardır)
- b. Kalıcı – Pankreas agenezisi
- c. Homozigot glukokinaz eksikliği

2.3. Tip 1_A DM [Insulin bağımlı diyabet (IDDM)]

Tip 1_A DM genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin etkisi ile pankreas adacık hücrelerinin ilerleyici otoimmün harabiyeti sonucu gelişen ve çocuklarda en sık görülen tiptir. Çocukluk çağı diyabetlerinin yaklaşık % 70-80’ini Tip 1_A oluşturmakta, Tip II DM % 20-25, TipI_B <%10 ve MODY <%5 oranında görülmektedir (4). Altıncı kromozomda yer alan MHC bölgesi belirlenen ilk tip 1 DM duyarlık lokusudur (*IDDM1*) ve HLA class II genleri bilinen en önemli genetik risk faktörleridir. Pankreas adacık hücrelerinin yüzey ve sitoplazmik komponentlerine karşı otoantikorlar, endojen insüline karşı otoantikorlar, antiglütamik asit dekarboksilaz antikorları

(GADA) , tirozin fosfataz gibi diğer adacık komponentlerine karşı antikorlar (IA-2) başlıca immun belirteçlerdir. Hastalığın erken döneminde pankreas adacık hücrelerinde lenfosit infiltrasyonu gözlenir. Otoimmün tiroid hastalıkları, çölyak hastalığı, vitiligo, addison hastalığı gibi diğer otoimmün hastalıkların Tip 1_A DM'a eşliği sıkça gözlenmektedir (2-5, 7,8, 11, 21,23,24)

2.3.1. Epidemiyoloji

Son 20 yılda tip 1 DM'nin epidemiyolojik paterni ile ilgili bilgilerde çok önemli bir artış sağlanmıştır. WHO tarafından 1990 yılında başlatılan DiaMonde (The Multi-National Project for Childhood Diabetes) çalışmasında 4 yıllık süreçte 75 milyon örnekli popülasyonda 14 yaşın altında toplam 20.000 çocuk diyabet tanısı almış ve insidans oranlarının çalışılan 100 toplum içinde >350 kat değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Oran Çin ve Venezuela'da 100.000'de 0,1'den, Sardunya'da 36,8, Finlandiya'da 36,5, İsveç, Norveç, Portekiz, İngiltere, Kanada ve Yeni Zellanda'da >20'e kadar değişmektedir. Topluluk 5 yaş grubuna ayrıldığında insidansın yaşla arttığı ve 10-14 yaş arasında doruk yaptığı gözlenmiştir (13) ABD'de 18 yaş altı okul çocuklarında diyabet prevalansı 1,7-2.5/1000, yıllık insidans 12-15/100000 olarak bildirilmektedir. Sıklık 5 yaşında 1/1430 iken, 16 yaşında 1/360'a çıkmaktadır (25). Türkiye'de 1996'da 19 bölgeyi kapsayan çok merkezli bir çalışmada 0-15 yaş arası diyabet insidansı 2,52/100000/yıl bulunmuştur (26). Bu sonuç komşu ülke insidanslarına (Yunanistan'da 4,5/100000/yıl) benzemektedir (27).

Ülkelerarası farklılıkların yanı sıra, ülke içi bölgesel farklılıklar da söz konusudur. Bu farklılık kısmen popülasyonlardaki heterojen etnik yapıya bağlı olmakla birlikte, genetik olarak nispeten homojen olan

İskandinav ülkelerinde de bölgesel farklılıklar göze çarpmaktadır. Bu veri genetik yatkınlığın çevresel değişkenliklerden önemli ölçüde etkilendiğini düşündürmektedir(28-29).

Hemen tüm ülkelerde tip 1 diyabet insidansı giderek artmakta olup, yaklaşık yıllık artışın ortalama % 3 olduğu belirtilmekte ve 1997'ye göre 2010 yılında % 40 oranında artış beklenmektedir. Ayrıca tip 1 DM insidansının 5 yaşın altındaki çocuklarda da artış gösterdiği dikkati çekmektedir (29,30).

Tip 1 diyabetin ortaya çıkışında mevsimsel farklılıklar gözlenmekte; sıklık ilkbahar, sonbahar ve kış aylarında artma gösterirken, yaz aylarında en düşük düzeye inmektedir. Erkek ve kızlar eşit olarak etkilenmekte ve sosyoekonomik durum ile ilgili belirgin bir bağlantı görülmemektedir (31).

2.3.2. Etiyoloji ve Patogenez

Tip 1 diyabet etyolojisinde genetik, çevresel ve otoimmün faktörler rol oynamaktadır.

Genetik yatkınlık

Diyabetlilerin anne, baba ve kardeşlerinde diyabet sıklığının diyabetli olmayanlara göre daha yüksek oluşu, biri diyabetli olan tek yumurta ikizlerinden diğesinde % 50'e yakın bir olasılıkla hastalık gelişmesi kalıtımın etkisini kanıtlayan klasik gözlemlerdir. Bu risk tip 1 diyabetlinin kardeşinde % 6, diyabetli anne ve babaların çocuklarında % 2-5'tir; babanın diyabetli olması durumunda risk yükselmektedir (Anne için % 2-3, baba için % 5-6)(29, 32-35).

Tip 1 diyabetin kalıtımla ilgili olduğunun bir diğer kanıtı da hastalığın 6. kromozom üzerinde yer alan histokompatibilite (HLA)

antijenleri ile ilişkisidir. Bazı HLA antijenlerinin bulunuşu diyabetin ortaya çıkışını kolaylaştırırken, bazıları engelleyici özelliktedir. HLA DR₃ veya DR₄ antijenlerinin varlığında tip 1 diyabet gelişim riski 2-3 kat iken, her ikisinin bir arada bulunması durumunda risk 7-10 kat artar. Tip 1 diyabetli hastaların yaklaşık % 95'i DR₃ veya DR₄ pozitifler (35,36).

Özellikle beyazlarda DQB₁ antijenindeki değişiklikler diyabet çıkışını önemli ölçüde etkilemektedir. HLA-DQ β zincirinde 57 pozisyonda aspartik asitin homozigot yokluğu (non-Asp/non-Asp) tip 1 diyabet gelişimi için rölatif riski 100 kat artırır. DQ α zincirinde 52 pozisyonunda arginin bulunuşu da tip 1 diyabete yatkınlık sağlar. HLA DRB₁*0301,*0401 ve HLA DQB₁*0302,*0301 allelerini taşımak yüksek risk getirirken; HLA DRB₁*0403, HLA DQB₁*0602, HLA DQA₁*0102 allelerini taşımanın koruyucu olduğu gösterilmiştir (35-40).

Kardeşlerde tip 1 diyabet çıkma olasılığı, hasta kardeşle aynı HLA haplotiplerini taşımasıyla ilişkilidir. Eğer kardeş indeks vaka ile her iki HLA haplotipini paylaşıyorsa tip 1 diyabet riski %12-20 iken, hiçbir haplotipin benzememesi halinde risk % 1-2'e inmektedir (41). Ancak genel toplumda HLA DR3 ve DR4 taşıyıcılık oranının % 50, non-Asp/non-Asp taşıyıcılığının ise % 20 bulunmasına rağmen, diyabet sıklığının % 0.4 olması kalıtım dışı faktörlerin önemini vurgulamaktadır (3).

Diyabetin ortaya çıkışında tek bir genin etkili olmadığı, hastalığın birden fazla genle ilgili (polijenik) kalıtımla aktarıldığı ve insan genomunda 20'den fazla bölgenin tip 1 diyabete yatkınlık oluşturduğu düşünülmekte, ancak bunların çoğunun diyabet gelişimine katkılarının büyüklüğü bilinmemektedir (3,35,42).

Çevresel faktörler

Son yıllarda birçok ülkede Tip 1 diyabet sıklığında gözlenen artış, hastalığın ortaya çıkışında viral enfeksiyonlar, beslenmeye bağlı faktörler, toksinler ve stres gibi çevresel etkilerin de önemli rol oynadığını göstermiştir (2-6,8,42).

Viral enfeksiyonlar direkt sitolitik etki veya otoimmün mekanizmalarla β hücre hasarını başlatır. Kabakulak, koksaki B₃, B₄ rubella ve sitomegalovirüs gibi bazı virüslerin pankreatotropik olduğu, β hücrelerini enfekte edebildiği ve epidemilerinin ardısıra tip 1 diyabet insidansında artış gözlemlendiği bilinmektedir (2- 4, 6,30, 42).

Süt çocukluğu döneminde inek sütüne erken başlanması ile diyabet ilişkisi üzerinde de durulmaktadır. Sığır serum albüminin 17 aminoasitlik bölümü ile adacık antijeni 69 arasındaki moleküler benzerlik, yeni tanı konmuş birçok diyabetli çocukta bovin serum albüminine karşı IgG grubu antikorların gösterilmiş olması, anne sütü ile beslenenlerde diyabet insidansının düşük bulunması ve kısa süreli (<3 ay) anne sütü alan ve erken inek sütüne başlanan bireylerde tip 1 diyabet sıklığının yaklaşık 1,5 kat arttığına işaret eden araştırmaların varlığı inek sütü ile erken bebeklik döneminde karşılaşmanın diyabet oluşumunda tetikleyici bir rol oynayabileceği varsayımını destekleyen bulgulardır (4,43-45). Öte yandan Finlandiya'da 1980'den sonra anne sütü verme süresi ve sıklığının artmasına rağmen tip 1 diyabet insidansındaki artışın devam etmesi ve DAISY (Diabetes Autoimmunity Study of the Young) (14) çalışmasının sonuçları bebek beslenmesi ve tip 1 diyabet ilişkisini desteklememektedir (3,46).

Tütsülenmiş et gibi nitrozaminden zengin besinlerin sık tüketilmesi, içme sularında yüksek nitrat içeriği ve düşük çinko düzeyi

gibi değişik beslenme faktörlerinin de tip 1 diyabetle ilişkili olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (30,47,48).

Çeşitli etnik gruplarda immünomodölatör etkisi olduğu bilinen D vitamini reseptör polimorfizminin tip 1 diyabete yatkınlık yaratabileceği gösterilmiş, Avrupa'da çok uluslu EURODIAB çalışmasında süt çocukluğunda D vitamini süplemantasyonunun ve annenin gebelik esnasında D vitamininden yoğun beslenmesinin daha sonraki çocukluk döneminde tip 1 diyabet gelişim riskini azalttığı belirtilmiştir (46,49-52).

Otoimmünite:

Otoimmün hastalıklar immün sisteminin otolog antijenlere karşı reaksiyon göstermesi ile oluşan doku hasarının sonucudur. Lenfositleri ve antijen sunan hücre (APC)'leri etkileyen immünolojik anormallikler, enfeksiyonlar veya doku zedelenmeleri sonucu ortaya çıkan antijenin tanınması gibi çeşitli faktörlerin otoimmünitenin gelişmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Klinik oluşmadan öncede varolan otoantikörler, pankreas β hücrelerinde lenfosit infiltrasyonu (insülitis) ve diğer otoimmün hastalıklarla birliktelik tip 1 DM için otoimmün göstergelerdir (9,24,53,54).

Otoimmun endokrin hastalıkların deneysel modellerinde T hücreleri hastalığın patogenezinde merkezi roldedir. Düşük düzeylerde hücresel immünite birçok normal bireyde otoimmun hastalığa ilerlemeksizin tolere edilebilir. Tolere edilebilen düzeylerden otoimmun hastalığa progresyonu yönlendiren faktörlerin tanımlanması hastalık patogenezinin anlaşılmasında ve hastalığı önleme çabalarında temel olacaktır.(55)

Self toleransın bozulması:

T ve B hücrelerinin reseptör içeriği, bu reseptörlerin antijen bağlanma bölgelerini kodlayan genlerin yeniden düzenlenmesi (rearrangement) sonucunda oluşmaktadır. Teorik olarak bu işlemle 109 farklı T hücre reseptörü oluşabilmekte ve bu reseptörlerden bazıları oto-antijenleri tanımaktadır. Bu oto reaktif hücrelerin elimine edildiği veya nötralize edildiği süreç ise "tolerans" olarak adlandırılmakta ve bu işlemlerin işleyişinde oluşan aksaklıklar otoimmünite ile sonuçlanmaktadır. (54,55)

Helper T hücreleri tüm immün cevaplarda anahtar düzenleyici rol oynamaktadırlar. Çeşitli otoimmün hastalıklar ile MHC molekülleri arasında genetik olarak ilişki olduğu gösterilmiştir ki, MHC moleküllerinin görevi T hücrelerine antijen sunmaktır (8).

T hücre toleransının temel mekanizması, self-reaktif T hücrelerinin timusda delesyonudur. Matür olmayan T hücreleri kemik iliğinden timusa göç etmekte, burada "major histocompatibility complex" (MHC) molekülleri ile sunulan peptidler ile karşılaşmakta ve peptid-MHC komplekslerine karşı düşük afiniteye sahip T hücreleri spontan apoptozise uğramaktadırlar. Ayrıca, peptid-MHC komplekslerine karşı yüksek afiniteye sahip T hücreleri de "negatif seleksiyon" yoluyla apoptozise uğrarlar. Kabul edilebilir düzeyde afiniteye sahip T hücrelerinin maturasyonu ise "pozitif seleksiyon" yoluyla timusda tamamlanmakta ve bu hücreler daha sonra periferel dolaşıma çıkmaktadırlar. Timusa gelen lenfositlerin % 90'ından fazlası delesyona uğramaktadır. Kısacası merkezi T hücre toleransının indüksiyonu için timusta otoantijenlerin varlığı gerekmektedir. Ancak merkezi toleransın bozulduğu durumlarda dahi periferel mekanizmalar

sayesinde self antijenlere cevapsızlığın sağlanabildiği de bilinmektedir.

Periferal T hücre toleransının bozulması:

Matür self-antijen spesifik T lenfositlerinde tolerans fonksiyonel anerji, apoptozis yoluyla delesyon veya regülatör hücreler yoluyla süpresyon sayesinde sağlanabilmektedir. T hücre toleransında rol oynayan bu mekanizmaların bozulması ile ortaya çıkan otoimmünite pek çok deneysel hayvan modelinde gösterilmiştir.

Genel olarak T ve B hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması için iki hücre dışı sinyal gereklidir. Birinci sinyal antijen sunan hücrenin MHC molekülü/antijenik peptid kompleksi ile T hücre reseptörü (THR) birlikteliğidir. İkincisi ise T hücre aktivasyonundan sorumlu ko-stimülatör molekül sinyalidir. Yalnızca THR, T hücrelerinin aktivasyonu ve efektör hücrelere dönüşümü için yeterli değildir ve ko-stimülatör sinyal yokluğunda tek başına THR, T hücre cevapsızlığı, anerji veya programlı hücre ölümü, apoptoz ile sonlanır. Başka bir deyişle tümüyle uzman ve yetkin T ve B hücrelerinin gelişmesi için ikincil bir ko-stimülatör sinyale gereksinim vardır. Ko-stimülasyon reaktif T hücre popülasyonunun çoğalmasını, hücrelerin enflamasyon bölgesine göçünü, enflamasyonun solubl mediatörlerinin üretimini ve T hücre alt grup farklılaşmasını düzenler. Perifer dokuların çoğu ko-stimülatör sinyaller sunmazlar. Böylece perifer antijenlerle reaktif T hücreleri arasındaki etkileşim, normalde beklenen T hücre aktivasyonu ile sonlanmaz. T hücre aktivasyonunun bu şekilde kontrol edilmesi, perifer dokulara, özellikle endokrin organlara toleransın düzenlenmesinde önemli olabilir. Ko-stimülatörlerin çarpık sunumu T hücre anerjisinin bozulmasına ve doku spesifik otoimmün reaksi-

yonlara neden olmaktadır. Tanımlanan ko-stimülatör sinyallerden en önemlileri olan aktivasyon molekülü CD₂₈ ile aktivasyon inhibitörü CTLA-4, glikoprotein yapısında hücre içi ve hücre dışı uzantıları olan homolog yapılardır.(55,56)

2.4. Sitotoksik T hücresi ile ilişkili antijen 4 (CTLA-4):

T hücrelerinin, antijen sunan hücreler üzerinde bulunan CD₈₀ ve CD₈₆ ligantlarına CD₂₈ ile bağlanmasından sonra CTLA-4 sunumu gerçekleşir. CD₂₈, APC üzerindeki CD₈₀/CD₈₆ ile etkileşim sonucu etkin antijen-özgün immun cevaplar için gerekli olan T hücre fonksiyonlarını güçlendirirken; CTLA-4, CD₈₀ ve CD₈₆ T hücre reseptörlerinde inhibitör etki oluşturarak CD₂₈ aracılı sinyalleri dengeler ve T hücrelerini anergi ya da apoptoza yönlendirerek lenfoid sistemin aşırı uyarılmasını önler. CD₈₆ molekülü ile ko-stimülasyonun etkisi, hücre yüzeyinde CD₂₈ ve CTLA-4'ün sunum düzeylerine bağlı bir denge halindedir (33,48). CD₂₈, CD₄ T hücrelerinin, % 80'inde, CD₈ T hücrelerinin ise % 50'sinde yapısal olarak ve T hücresi aktivasyonu sonucu artarak sunulur. Buna karşılık CTLA-4 dinlenim durumundaki T hücrelerinin yüzeyinde bulunmaz. Hücre içinde sentez edilir ve hücre yüzeyinde sunumu T hücre aktivasyonundan 48 saat sonra maksimuma ulaşır (11,16,53,57,58).

CTLA-4'ü kodlayan genin yokluğunda veya CTLA-4'e spesifik antikorlarla bu molekül bloke edildiğinde, fatal otoimmün reaksiyonlar ortaya çıkmakta, kalp, pankreas ve diğer organlarda T hücre infiltrasyonu sonucu doku yıkımı oluşmakta, ensefalomyelit ve diyabet oluşturulan hayvan modellerinde ise otoimmün doku hasarı ağırlaşmaktadır. Yine CTLA-4 molekülünün spesifik Ig'ler ile bloke edilmesi sonucu immünoproliferatif hastalıkların geliştiği

gösterilmiştir (16,59). Yani self-antijenlere karşı oluşabilecek immün cevapları önlemekle yükümlü CTLA-4'ün bu fonksiyonunun ortadan kalkması veya bloke edilmesi otoimmünite ya da mevcut otoimmün hastalığın progresyonunun hızlanması ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle CTLA-4 geni tip 1 DM gelişimi ile ilgili olduğu düşünülen aday genler arasında özel bir ilgi odağı oluşturmuştur (*IDDM12* duyarlık lokusu, kromozom 2q33).

Bir popülasyonda varolan genetik çeşitliliğe polimorfizm denir. Bu doğal farklılıklar kuşaktan kuşağa Mendel yasalarına göre aktarılırlar. İnsan genomunda tek baz değişiklikleri çok sıktır. Bazılarına göre bu sıklık her 100 baz çiftinde bir olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak bu nükleotid değişikliklerinin büyük çoğunluğu zararsızdır.

CTLA-4 geninde 3 polimorfik bölge bilinmektedir: Ekzon 1 49. pozisyonda A/G polimorfizmi, ekzon 3'de mikrosatellit polimorfizmi ve pozisyon - 318'de promoter polimorfizmi. Son iki polimorfizm hakkında yapılan çalışmalar sınırlıdır ve CTLA-4 49 A/G polimorfizmi ile dengesiz bağlantı (linkage disequilibrium) gösterdiği düşünülmektedir (40,52).

3. OLGULAR VE METOD

3.1. Olgular

Kliniğimizde tip 1 DM tanısı ile takip edilen 91 hasta çalışmamıza alındı. Hastaların CTLA-4 ekzon 1 kodon 49'daki polimorfik bölgesindeki genotipleri analiz edildi. Demografik özellikleri, klinik başvuru şekilleri, aile hikâyesinde tip 1 ve/veya tip 2 DM bulunması, otoimmün hastalıklarla beraberlik, otoantikor pozitifliği gibi etyolojik faktörler ile ilişki sorgulandı. Metabolik regülasyon parametreleri kaydedildi. Bu çalışma için, hastalardan DNA ayrılması amacıyla EDTA'lı tüpe kan alınması dışında yeni laboratuvar tetkiki istenmedi.

Ayrıca, bilinen diyabet otoimmün ve kronik hastalığı olmayan 100 sağlıklı erişkin bireyden, bilgi verilerek izinleri alınmak suretiyle kan örneği alınarak, Türk popülasyonunda bu polimorfizmin genotipik oranlarını tespit etmek üzere kontrol grubu oluşturuldu.

3.2. DNA İzolasyonu

Hastalardan ve kontrol grubundan EDTA içeren tüpe 2cc venöz kan örneği alındı. DNA izolasyonu K0512 Fermentas DNA Ekstraksiyon Kit (Genomik DNA Purifikasyon Kiti)'inin öngördüğü şekilde yapıldı.

- a) 1.5ml'lik bir ependorf tüpünde 200µl kan ve 400µl lizis tampon karıştırıldı.
- b) 65 °C de karışım su banyosunda 5dk. inkübe edildi.
- c) 5 dk sonunda üzerine 600µl kloroform eklenerek kuvvetlice karıştırıldı.
- d) 10000 rpm'de 2dk santrifüj (Heuracaeus marka) edildi.

- e) 2 dk sonunda, üstte kalan süpernatant, daha önce hazırlanmış olan 720µl distile su ve 80µl presipitasyon solüsyonu içeren karışımın üzerine eklendi ve DNA görünür hale gelene kadar alt üst edildi.
- f) DNA görünür hale geldikten sonra, 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek DNA çöktürüldü.
- g) Üstteki sıvı döküldükten sonra, pelletin üzerine 100µl NaCl eklenerek oda ısısında çözünene kadar bekletildi.
- h) DNA çözündükten sonra üzerine 1ml absolü alkol eklenerek alt üst edildiğinde DNA tekrar görünür hale geldi.
- i) 10000rpm'de 2dk santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve DNA kurutuldu.
- j) 100µl distile su ile çözündürülüp spektrofotometrik ölçüm yapılarak, DNA miktarı tayin edildi ve -30°C de çalışılana kadar depolandı.

3.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Elde edilen DNA örneklerinden CTLA-4 ekzon 1 kodon 49. pozisyonunda A/G polimorfizmi belirlenmek üzere PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) metodu kullanıldı. (PCR, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısıda birbirinden ayrılması (denatürasyon), sonra sentetik oligonükleotidlerin DNA'ya bağlanması (hibridizasyon), daha sonra zincirin uzaması (polimerizasyon) ve bu reaksiyonların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım ile (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) PCR reaksiyonu oluşturulur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı bir çift sentetik

tamamlayıcı primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır.)

PCR reaksiyonu:

—10X(100mM Tris-HCl(pH 8,8), 500mM KCl içeren) Taq tampon solüsyonundan 5µl

—MgCl₂ (3mM)

—dNTP karışımı(dATP, dGTP, dCTP, dTTP) her birinden 200µM

—20 pmol forward primer: 5' GCTCTACTTCCTGAAGACCT 3'

—20 pmol reverse primer: 5' AGTCCTCACTCACCTTTGCAG 3'

—4 Ünite Taq DNA polimeraz enzimi

—100–500 ng genomik DNA

Toplam reaksiyonu 50µl'ye tamamlayacak kadar distile su kullanılarak gerçekleştirildi.

DNA Thermal Cycler 480(Perkin Elmer) de amplifikasyon yapıldı.

95°C 4dk. (başlangıç denatürasyonu) 1 döngü

95°C 1dk. (denatürasyon)

55°C 1dk. (bağlanma)

72°C 1dk. (uzama)

72°C 4dk. (son uzama)

35 döngü

1 döngü

Amplifikasyonun varlığını gözlemlemek için, etidium bromid (10mg/µl) içeren %2'lik agaroz jelde, örneklerle beraber bir DNA size marker yüklenerek 120V'da 20 dak. yürütüldükten sonra (Bio-Rad

elektroforez sistemi), UV transilluninatör'de amplifikasyon olup olmadığı değerlendirildi.

Restriksiyon enzimi ile kesim öncesi PCR ürünlerinin Fenol-Kloroform yöntemi ile temizlenmesi

Stok oluşturmak için, fenol ve kloroform eşit miktarda karıştırıldı.

- a) 200µl'lik ependorf tüpünde 50µl amplifikasyon ürünü ve 50µl fenol-kloroform karışımı karıştırıldı ve vortekslendi.
- b) 14000 rpm'de 2dk. santrifüj edildi.
- c) 500 µl'lik bir ependorf tüpüne süpernatant alındı ve üzerine %10'luk sodyum acetate(5µl), 120µl absolu alkol ilave edildi. -70°C de 30dk. bekletildi.
- d) 30dk sonunda 14000 rpm'de 15dk santrifüj edildi.
- e) Üstteki sıvı döküldü ve pellet %70'lik alkol ile yıkandı.
- f) Pellet kurumaya bırakıldı ve 20µl distile su ile çözündürüldü. -20°C de kesim yapılncaya kadar depolandı.

3.4. Bbv1 Restriksiyon Enzimi ile Kesim

CTLA-4 ekzon 1 kodon 49. pozisyonunda A/G polimorfizmi için toplam 10µl'lik kesim reaksiyonu hazırlandı.

1X tampon solüsyonu 1µl (33mM Tris-acetate (pH7.9), 10mM magnesium acetate, 66mM potassium acetate, 0.1mg/ml BSA içeren)

Bbv1 enzimi (Fermantas) 2µl (µl/3ünite)

Amplifikasyon ürünü 20-50 ng(5µl)

Distile su ile 10µl'ye tamamlandı.

Örnekler 3 saat 37°C de etüvde inkübe edildi. Sonuçlar, %3'lük etidium bromid içeren agaroz jelde, 1X TBE(Tris-Borik asit-EDTA)

tampon solüsyonunda, 45dk. 100V'da yürütüldü. UV transilluminatörde kesim sonuçları değerlendirildi.

Kit ile ayrılmış olan genomik DNA UV spektrofotometride ve agaroz jel elektroforezinde değerlendirildi. Çift zincir DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Thermo Labsystems spektrofotometride, multiskan spectrum programı kullanılarak belirlendi. Çift zincir DNA'nın konsantrasyonunu belirlemek için OD260 da ölçüm yapıldı. DNA'nın saflığını belirlemek için ise OD260/OD 280 oranı belirlendi. Saf bir DNA'nın OD260/OD 280 oranı yaklaşık olarak 1,8'dir.

PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde belirlendi. PCR ürünlerinin büyüklükleri CTLA-4 ekzon 1 kodon 49 pozisyonunda A/G polimorfizmi için 162 bp idi. DNA size marker ile gözlenen DNA bantlarının büyüklükleri doğrulandı.

CTLA-4 ekzon 1, A49G, 162 bp

CTLA-4 ekzon 1 A kodon 49G (kodon 17)

TGA → TGG

Thr → Ala

Bbv1 ile kesim

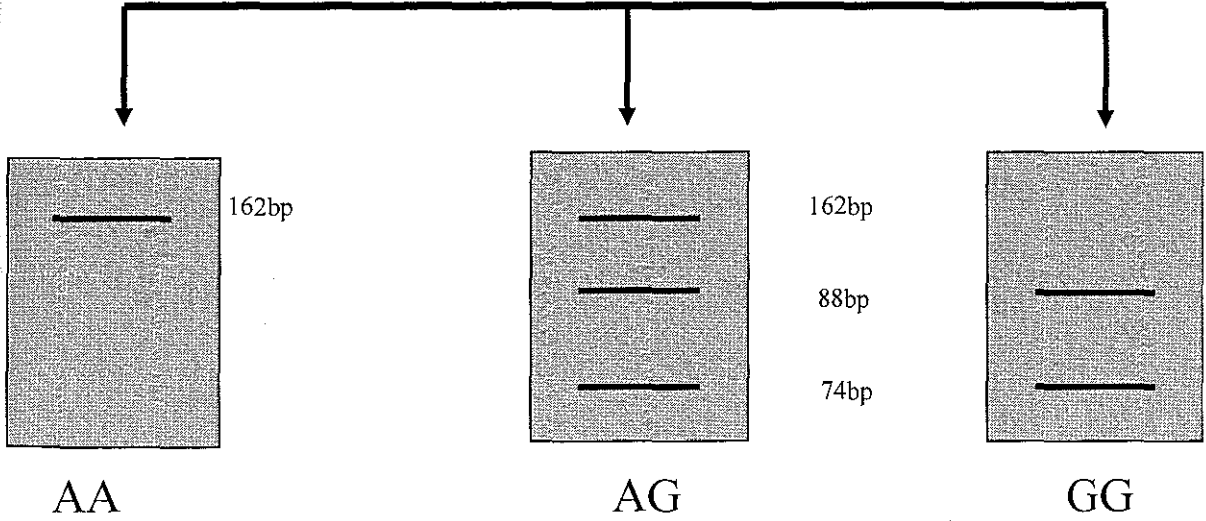
Yabanıl Tip

162bp

Polimorfik

88bp ↓ 74bp

162bp



Şekil 1. Bbv1 enzimi ile yabanıl tip, heterozigot ve homozigot mutant bireyler için beklenen fragment büyüklükleri.

Bbv1 kesim enzimi ile A49G polimorfizminin belirlenmesi:

A49G polimorfizmi, kodon 49'da treonin'in alanin'e dönüşmesine neden olur. Amplifiye olmuş PCR ürünü 162bp'dir. A49G polimorfizmi Bbv1 için bir tanıma ve dolayısıyla kesim bölgesi oluşturur. Bu durumda Bbv1 enzimi, G polimorfizmi bulunduğunda kesim yapacak. A polimorfizmi bulunduğunda ise kesim olmayacaktır. Bir başka deyişle, AA homozigotlarda kesim olamayacağından 162bp'lik tek bir bant, GG homozigotlarda ise 88bp ve 74bp olarak iki bant görünecek. Heterozigot bireylerde beklenen fragment büyüklükleri; 162bp, 88bp ve 74bp'dir.

3.5. İstatistiksel Analiz: İstatistik analiz için SPSS 10.0 yazılımı kullanıldı. Numerik veriler Mann-Whitney U, nominal veriler Chi-Square (Ki kare) testi ile karşılaştırıldı.

4. SONUÇLAR

Çalışmaya alınan tip 1 diyabetli çocukların yaşları, 3 ile 19 yıl (ortalama 11,7 yıl) arasında değişmekteydi. Hasta grubu tanı yaşları 1,5 ile 18 yıl (ortalama 8,5 yıl) arasında değişen 52 kız (%57), 39 erkek (%43), toplam 91 olgudan oluşmakta idi. Hastaların Pediatrik Endokrinoloji bilim dalımızca izlem süreleri ortalama 3,2 yıl (0,2-18 yıl) idi. Kontrol grubu olarak, bilinen diyabet ve otoimmün bir hastalığı bulunmayan 100 erişkin alındı.

Hastaların ve kontrol grubunun CTLA-4 ekzon 1 kodon 49 A/G polimorfizmi genotip dağılımı tespit edildi. Tip 1 diyabetli çocuklar ve kontrol grubunda sırasıyla A/A homozigot genotipi (%) 41,8 ve 43,4 ($p>0.05$), A/G heterozigot genotipi (%) 44,0 ve 49,5 ($p>0.05$), G/G homozigot genotipi (%) 14,3 ve 7,1 ($p>0.05$) oranında saptandı. İki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık yoktu. Tip 1 diyabetli çocuklarda G alleli sıklığı % 36 iken, kontrol grubunda % 32 olarak benzer bulundu. Tip 1 DM ve kontrol grubunun genotip ve allel dağılım sonuçları Çizelge 3 te gösterilmiştir.

Hastaların cinsiyet, tanı yaşları, klinik başvuru şekilleri, ailede diyabet hikayesi, otoimmün hastalık birlikteliği, somatik gelişim, başlangıç ve izlem boyu HbA_{1c} ve ortalama insülin dozları ile CTLA-4 ekzon 1 kodon 49 A/G polimorfizm genotip ve allel sıklığı arasındaki ilişki araştırıldı. Sonuçlar Çizelge 4 te görülmektedir.

Çizelge 3: Tip 1 diyabet ve kontrol grubunun genotip ve allel dağılımı.

	T1D (n:91)	Kontrol (n:99)	P
A/A (%)	38 (41,8)	43 (43,4)	>0.05
A/G (%)	40 (44)	49 (49,5)	>0.05
G/G (%)	13 (14,3)	7 (7,1)	>0.05
A allel (%)	64 (116)	68 (135)	>0.05
G allel (%)	36 (66)	32 (63)	>0.05

Genotip grupları arasında cinsiyet dağılımı açısından anlamlı farklılık gözlenmedi.

Tip 1 diyabetin ortaya çıkış yaşının GG homozigot hasta grubunda (ortalama 7,5 yıl) diğer genotip gruplarına (A/A genotipinde 8,3 yıl, A/G genotipinde 9,9 yıl) göre düşük saptanmasına karşın, fark anlamlı değildi.(p=0,4)

Hastaların başvuru kliniği olarak %47'sinde diyabetik ketoasidoz (n:43), %32'sinde ketozis (n:29), %21'inde hiperglisemi (n:19) mevcuttu ve farklı klinik başvuru şekilleri ile genotip arasında anlamlı ilişki bulunamadı.

Aile bireylerinde tip 1 diyabet % 6,6, tip 2 diyabet ise % 47,3 oranında bulunmaktaydı. Ailede tip1 ve/veya tip 2 diyabet bulunması ile CTLA-4 polimorfizmi arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanamadı.

Hastalarımızın 19'unda (% 20,9) otoimmün hastalık [(otoimmün tiroidit (n:17), çölyak hastalığı (n:2)] beraberliği mevcuttu. Bu hastalar ile otoimmün hastalık eşliği olmayan olgular arasında CTLA-4 polimorfizmi açısından anlamlı istatistiksel fark gözlenmedi.

β hücrelerine karşı gelişen otoantikorlar, GADA, İCA, AİA sırasıyla 31, 46, 43 hastada bakılabildi. Otoantikor pozitiflik sıklığı genotipe göre değişkenlik göstermedi. Hastalar başvuru HbA_{1c} ve izlem boyu ortalama HbA_{1c} düzeyleri ve insulin dozlarına göre irdelendiğinde, A/G polimorfizminin bu ölçütlerde etkili olmadığı görüldü.

Çizelge 4: Tip 1 diyabetli olguların klinik ve laboratuvar özelliklerinin genotip ve allel dağılımına göre irdelenmesi

	A/A (n:38)	A/G (n:40)	G/G (n:13)	A allel(n:38)	G allel(n:53)	p
Cinsiyet						
erkek	16	18	5	16	23	>0.05
kız	22	22	8	22	30	>0.05
Yaş	11	11,6	11,3	11	11,5	>0.05
Tanı yaşı	8,3	9,9	7,5	8,3	9,3	>0.05
Diabet süresi	3,2	3,17	3,74	3,2	3,31	>0.05
Klinik						
diabetik ketoasidoz (n:43)	20	18	5	20	23	>0.05
ketosis (n:29)	11	15	3	11	18	>0.05
hiperglisemi (n:19)	7	7	5	7	12	>0.05
Ailede diabet öyküsü						
tip 1 (n:6)	1	3	2	1	5	>0.05
tip 2 (n:43)	17	21	5	17	26	>0.05
tip 1 ve tip 2 (n:6)	2	2	2	2	4	>0.05
Otoimmün hastalık (n:19)	7	9	3	7	12	>0.05
GAD-Ab pozitifliği (%) (n:31)	45,5 (5/11)	66,7 (10/15)	40 (2/5)	45,5 (5/11)	60 (12/20)	>0.05
ICA pozitifliği (%) (n:46)	5,9 (1/17)	17,4 (4/23)	33,3 (2/6)	5,9 (1/17)	20,7 (6/29)	>0.05
AIA pozitifliği (%) (n:43)	26,3 (5/19)	29,4 (5/17)	0 (0/7)	26,3 (5/19)	20,8 (5/24)	>0.05
Tanı anı HbA _{1c} (%)	11	11,6	11,3	11	11,5	>0.05
Ortalama HbA _{1c} (%)	8,6	8,7	9,1	8,6	8,8	>0.05
Ortalama insulin dozu (U/kg/g)	0,73	0,85	0,74	0,73	0,82	>0.05
Delta Hsds	-0,9	-0,8	-0,6	-0,9	-0,6	>0.05

5. TARTIŞMA

İnsan genomundaki fizyolojik yolağlarını değiştirerek multifaktöriyel hastalıklara eğilim yaratan DNA varyantları, primer nedensel risk faktörlerini oluşturur. Tip 1 DM pankreas adacık hücrelerinin T hücre-aracılı yıkımıyla karakterize otoimmün bir hastalıktır. Tip 1 DM gelişiminde rol oynayan genlerin tanımlanması, söz konusu genin tip 1 DM duyarlılığı üzerindeki gerçek etkisini göstermekle kalmayıp, β hücre harabiyetine yol açan gen-çevre etkileşimini de ortaya koyacaktır.

İmmün sistem genleri aday genler arasında en fazla dikkat çeken gruptur. Tip 1 DM duyarlılık lokuslarından IDDM12, 2. kromozom q33'te CD28, ICOS (inducible co-stimulator) ve beta hücre otoimmünitesinin önlenmesinde umut verici hedeflerden biri olan CTLA-4 geni gibi çeşitli aday genleri içerir (12,60-69).

CTLA-4 ekzon 1 49. pozisyondaki A-G polimorfizminin otoimmün bir hastalıkla ilişkisi ilk kez 1995' te Yanagawa ve arkadaşlarınca (70) gösterilmiş ve Graves hastalığından sonra, otoimmün tiroidit, addison ve çölyak hastalığı gibi diğer otoimmün hastalıklar ile ilişkisi çeşitli toplumlarda çalışılarak otoimmün sürece etkisi araştırılmıştır (24, 71, 72).

49G aleli, 49A allele göre aktive T hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmede daha az etkilidir. Lider peptidin görevi, bir sinyal peptid olarak sekrete edilen proteini endoplazmik retikuluma yönlendirmektir. Lider peptid pozisyon 17'de Thr/Ala substitüsyonu olasılıkla CTLA-4 geninin "adresini" değiştirmek ve "hücre içi CTLA-4 havuzu" ile etkileşim sonucu hücre içi-hücre yüzeyi arasındaki

CTLA-4 geçişini bozmak yoluyla molekülün fonksiyonunu etkilemektedir. Yani G49 allelinin otoimmün hastalıklarda, hücre yüzeyindeki CTLA-4 ile CD₂₈ arasındaki yarışta dengesizlik yaratarak bir “hastalık modifiye edici faktör” rolünde olduğu söylenebilir (73).

Lider peptidte treonin/alanin (Thr/Ala) değişikliğine yol açan ekzon 1 49.pozisyon A/G polimorfizminin başta diyabet olmak üzere otoimmün hastalıklarla ilişkisi birçok toplumda araştırılmıştır (70,74-77). IDDM ve CTLA-4 polimorfizmi arasındaki bağlantı İtalyan, İspanyol, Fransız, Meksika kökenli Amerikalı, Kafkas kökenli Amerikalı ve Koreli olmak üzere 6 farklı toplumda saptanmıştır. Bu toplumların birleşik verileri değerlendirildiğinde IDDM ve CTLA-4 arasında bağlantının çok anlamlı olduğu görülmüştür ($p=10^{-6}$). Bununla beraber 284 İngiliz ailesinden oluşan büyük bir seri ile nispeten küçük Çin ve Sardunya serilerinde anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Bu üç toplumun verileri de değerlendirmeye katıldığında toplam 1026 ailede IDDM ve CTLA-4 arasında bağlantı için anlamlılık yine oldukça yüksek bulunmuştur ($p=0.00005$). Bu veri, “CTLA-4 bölgesinde bulunan genin” DM için duyarlık oluşturduğuna dair güçlü bir kanıt olarak kabul edilebilir (78).

Çalışmamızda tip 1 diyabetli Türk çocuklarında CTLA-4 A/G polimorfizmi ile IDDM gelişim riski arasında bir bağlantı saptanmamıştır. Bu sonuç hasta topluluğumuzun volümü ile ilgili olabilir. Çünkü olgu-kontrol çalışmaları çalışılan olguların homojenitesi kadar, örnek büyüklüğüne de son derece duyarlıdır. Örnek hacmi arttıkça, iki grup arasındaki anlamlı farklılığı saptama olasılığı artacağı için çok büyük veri setleri çalışılmadıkça, hastalar ve kontrol grubu arasındaki küçük farklılıklar saptanamayabilir. Ayrıca CTLA-4 A/G polimorfizmi ile IDDM₁₂ etyolojik mutasyonu

arasındaki dengesiz bağlantı bizim çalışma grubumuzda anlamlı ilişki bulunan toplumlarınkinden farklı olabilir. Başka bir deyişle, etyolojik mutasyon ile CTLA-4 A/G arasındaki dengesizlik ilişki bulunan toplumlardaki kadar sıkı olmayabilir.

Kompleks hastalık genlerini haritalamak, birçok genin etkili olması, her bir genin total ailesel yığılının çok küçük bir yüzdesini oluşturması ve belirli etyolojik mutasyonların tüm etnik gruplarda veya coğrafik topluluklarda bulunmaması, yani genetik heterojenite gibi faktörler nedeniyle zordur. Tip 1 DM gibi kompleks genetik hastalıkların ailesel formlarında duyarlık faktörleri risk haplotipinde yığılan minör risk faktörlerinin ortak etkisi tarafından da oluşturulabilir. Bu durumda hastalık için kritik bölgedeki ilave genetik faktörler elbette dışlanamayacaktır.

CTLA-4 genindeki farklı polimorfizmler farklı etnik grup ve çevrelerde tip 1 DM ile farklı biçimde birliktelik gösterebilir ve farklı antijenik ve çevresel faktörler, tip 1 DM'e yatkınlık yaratan farklı mutasyonları tetikleyebilir. Bu olgu toplumlararası heterojen sonuçları açıklayabilir. CTLA-4 genindeki diğer aday polimorfizm 3'-UTR (AT)_n tekrarıdır. Eğer etyolojik mutasyon 3'-UTR mikrosatellit ise, bizim verilerimiz ve diğer negatif sonuçlar 3'-UTR mikrosatellitin tip 1 DM'e eğilim yaratan allelleri ile +49 G alleli arasında herhangi bir dengesiz bağlantının varolmadığını düşündürmektedir.

Hastalığın ortaya çıkış yaşı ile CTLA-4 polimorfizmi arasında anlamlı ilişki saptanan çalışmalar mevcuttur (66,67). Çalışmamızda CTLA-4 gen A/G polimorfizmi ile Tip 1 diyabetli hastaların klinik özellikleri karşılaştırıldığında, GG homozigot hastaların yaş ortalamasının diğer gruplara oranla düşük olmasına karşın, istatistiksel anlamlı farklılık bulunamadı.

CTLA-4 gen A/G polimorfizminin Tip 1 diyabetli hastalardaki klinik seyir üzerine etkilerini gösterebilmek amacıyla, kötü kontrol ölçütleri gösteren hastalarımızın genotipleri, iyi kontrollü hasta grubuyla karşılaştırıldı. Kötü kontrol parametreleri olarak alınan ölçütlerin birçok değişkenden etkilenebileceği göz ardı edilemese de, büyüme ve pubertal gelişimleri, ortalama insülin dozları, ortalama HbA_{1c} düzeyleri ve mikro/makro komplikasyonlar açısından değerlendirilen diyabetli hastalarda GG genotipi ve G allelinin taşınması ile ilişki saptanmadı. Ancak G alleli taşımanın kötü metabolik kontrol açısından ilave bir risk faktörü oluşturduğu gözlemlendi (G allel için OR:1,24 iken, A allel için OR: 0,76). CTLA-4 ün, tip 1 diyabete yatkınlık sağlayan HLA allelleri ile olası ilişkisi yüksek maliyet nedeniyle gerçekleştirilemedi.

Sonuç olarak, çalışmamızda CTLA-4 +49 A/G polimorfizminin Türk çocuklarında tip 1 DM gelişim riskini etkilemediği gözlemlendi. Ancak Türk toplumunda tanımlanan tüm polimorfik CTLA-4 allellerinin daha geniş hasta serilerinde çalışılması ile IDDM₁₂ lokusu ile ilgili anlamlı sonuçlara ulaşılması da olasıdır. Diyabet patogenezinde genetik temelli hücrel mekanizmaların belirlenmesi, polimorfik bölgelerin ve klinik önemlerinin anlaşılması, gelecekte diyabet gelişme riski olanların saptanmasına ve hastalığı önleyici daha kesin stratejilerin belirlenmesine yardımcı olurken, polimorfizmlerin kalıtımı klinik seyir, hastalığın şiddeti ve tedavi yanıtı hakkında da yol gösterici bilgiler oluşturacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Dinneen SF, Rizza RA. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. In: DeGroot LJ, Jameson JL, (eds): Endocrinology, 4th ed. WB Saunders Company, Philadelphia, 2001: 756-63.
2. Eisenbarth GS, Polonsky KS, Buse JB. Type 1 Diabetes Mellitus In: Larsen PR (ed) Williams Textbook of Endocrinology, 10th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2003; 1485-1501.
3. Amiel SA, Buchanan CR. Diabetes Mellitus. In: Brook CGD, Hindmarsh PC, (eds): Clinical Pediatric Endocrinology, 4th ed. Blackwell Science Ltd, Paris, 2001:411- 40.
4. Rosenbloom AL, Silverstein JH. Diabetes in the Child and Adolescent. In: Lifshitz F (ed): Pediatric Endocrinology, 4th ed. Marcel Dekker, Inc, New York, 2003: 611-53.
5. Fiallo-Scharer RU, Eisenbarth GS, Pathophysiology of Insulin-dependent Diabetes. Pescovitz OH, Eugster EA (eds) Pediatric Endocrinology. Lippincott Williams & Wilkins 2004; 28: 411-26
6. Steck AK, Rewers MJ. Epidemiology and Geography of Type 1 Diabetes Mellitus. In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H, Zimmet P, (eds): International Textbook of Diabetes Mellitus, third edition. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 2004; 15-33.
7. Cruickshanks KJ, LaPorte RE, Dorman JS, et al. The epidemiology of insulin-dependent diabetes mellitus: etiology and prognosis. In: Ahmad PI, Ahmad N (eds). Coping with

- juvenile diabetes. Springfield, IL: Charles C. Thomas 1985; 332- 57.
8. Kimpimaki T. Clinical Significance of Autoantibodies Associated with Type 1 Diabetes in Young Children. Acta U. Academic dissertation 2002; 3-93.
 9. Herratha M, Homann D. Islet regeneration needed for overcoming autoimmune destruction considerations on the pathogenesis of type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes* 2004; 5: 23-28.
 10. Chrousos GP, Elenkov IJ. Interactions of the Endocrine and Immune Systems. In: DeGroot LJ, Jameson JL, (eds): *Endocrinology*, 4th ed. WB Saunders Company, Philadelphia, 2001: 571- 87.
 11. Herold KC, Bluestone JA. Immunologic Mechanisms Causing Autoimmune Endocrine Disease. In: DeGroot LJ, Jameson JL, (eds): *Endocrinology*, 4th ed. WB Saunders Company, Philadelphia, 2001: 556-71.
 12. Badenhoop K. CTLA4 variants in type 1 diabetes: some stirrups serve better backing endocrine autoimmunity. *Clin Endocrinol.* 2000; 52 : 139-40.
 13. Einarsdottir E, Soderstrom I, Lofgren-Burstrom A, Haraldsson S, Nilsson-Ardnor S, Penha-Goncalves C et al. The CTLA4 region as a general autoimmunity factor: an extended pedigree provides evidence for synergy with the HLA locus in the etiology of type 1 diabetes mellitus, Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Eur J Hum Genet.* 2003; 11: 81-4.
 14. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain et al. Association of the T-cell regulatory gene

- CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003; 29: 506-11.
15. Maurer M, Loserth S, Kolb-Maurer A, Ponath A, Wiese S, Kruse N. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics*. 2002; 54: 1-8.
16. Abbas KA, Lichtman HA, Poper J. Self-Tolerance and Autoimmunity. Saunders text Cellular and Molecular Immunology 3th ed. 2001; 19: 414-18.
17. Akar N. Klinik Moleküler Patolojiye Giriş. Ankara Üniversitesi Basımevi 1999; 174-225.
18. Dursun O. Bronşial Astımlı Çocuklarda Transforming Growth Faktör Beta-1 Gen Polimorfizmi. Uzmanlık tezi 2003; 3.
19. Deyneli O. Diyabet tarihçesi.2004; [http:// www.diabservis.com](http://www.diabservis.com).
20. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-97.
21. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15: 539-43.
22. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2000; 23: 4.
23. Paronen J, Eisenbarth GS. Immunopathogenesis of Type 1 Diabetes Mellitus in Western Society. In: DeFronzo RA,

- Ferrannini E, Keen H, Zimmet P, (eds): International Textbook of Diabetes Mellitus, third edition. John Wiley&Sons Ltd, West Sussex, 2004; 495-515.
24. Liu E, Eisenbarth George S. Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2002; 31: 391-410.
 25. Kyloo CJ, Nuttall FQ. Prevalence of diabetes mellitus in school age children in Minnesota. *Diabetes Care* 1990; 13:1062-68.
 26. Günöz H, Oraltay İ, Güven P. National Working Group for Child and Adolescent diabetics. *Diabetes , Nutrition and metabolism*, 1999; 12: 3-232
 27. Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group. *Diabetologia*. 1993; 36(10): 883-92. Review. Erratum in: *Diabetologia* 1994; 38(6): 642.
 28. Rytönen M, Ranta J, Tuomilehto J, Karvonen M. Bayesian analysis of geographical variation in the incidence of type 1 diabetes in Finland. *Diabetologia* 2001; 44: 37-44.
 29. Hirschhorn JN. Genetic epidemiology of type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes* 2003; 4: 87-100.
 30. *Pediatric Endocrinoloji. Pediatik endokrinoloji ve oksoloji derneği yayınları*. 2003; 10: 415-57.
 31. Willis JA, Scott RS, Darlow BA et al. Seasonally of Birth and onset of clinical disease in children and adolescents (0-19year)

- with type 1 diabetes mellitus in Canterbury, New Zealand. *J Pediatr Endocrin Metab* 2002; 15: 645-47.
32. Kumar D, Gemayel WS, Deagen D et al. North American twins with IDDM: genetic etiological and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity and interval after diagnosis in first twin. *Diabetes* 1993; 42: 1351-63.
33. Dahlquist G, Blom L, Tuvemo T et al. The Swedish childhood diabetes study results from a 9 year case register and a 1 year case-referent study indicating that type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus is associated with both type 2 (non- insulin dependent) diabetes mellitus and autoimmune disorders. *Diabetologia* 1989; 32: 2-6.
34. Warram JH, Krolewski AS, Gottlieb MS et al. Differences in risk of insulin- dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers. *N Engl J Med* 1984; 311: 149-52.
35. Karen F. Tait and Stephen C. L. Gough The genetics of autoimmune endocrine disease *Clinical Endocrinology* 2003; 59: 1-11.
36. Tait KF, Gough SC. The genetics of autoimmune endocrine disease. *Clin Endocrinol.* 2003; 59: 1-11.
37. Bain SC, Ann Kelly M, Mijovic CH and Barnett AH. Genetic factors in the pathogenesis of type 1 diabetes in. *Textbook of diabetes I.* (eds, JC Pickup and G Williams). 3rd ed. Blackwell Publishing, 2003; 15:1-14.
38. Dorman J, La Porte R, Stane R, Trucco M. Worldwide differences in the incidence of type 1 diabetes are associated with amino acid variation at position 57 of the HLA DQ beta chain *Proc Natt Acad Sc: USA* 1990 87: 7370.

39. Khalil I, Auriol L, Gobet M. A Combination of HLA-DQ beta Asp 57-negative and HLA-DQ alpha ARC 52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1990; 85: 1315.
40. Anjos S, Polychronakos C. Mechanisms of genetic susceptibility to type I diabetes: beyond HLA. *Mol Genet Metab*. 2004; 81(3): 187-95.
41. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. Saunders Text and Review Series 4th ed, WB Saunders Company 2001; 7: 154-57.
42. Lernmark A. Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus: Etiology, Pathogenesis, and Natural History. In: DeGroot LJ, Jameson JL, (eds): Endocrinology, 4th ed. WB Saunders Company, Philadelphia, 2001; 763-76.
43. Richard E. Behrman Nelson Textbook of Pediatrics edition, 17th edition Saunders Published 2003; 583: 1947-72.
44. Gerstein HC. Cow's milk exposure and type of diabetes mellitus: a critical overview of the clinical literature. *Diabetes Care* 1994; 1: 13-19.
45. Scott FW, Norris JM, Kolb H. Milk and type 1 diabetes: examining the incidence and broadening the focus. *Diabetes Care* 1996; 19: 379-83.
46. Hyppönen E. Growth and Nutrition in the Etiology of Type 1 Diabetes. *Acta U. Academic dissertation* 2001; 5-38.
47. Hoglund B, Ryckenberg K, Selinus O, Dohlquist G. Evidence of relationship between childhood-onset type 1 diabetes and low groundwater concentration of zinc. *Diabetes Care* 1996; 19: 873-5.

48. Mac Farlane AJ and Scott FW. Environmental agents and type 1 diabetes, in: Textbook of Diabetes 1 (eds JC Pickup and G Williams) 3rd ed. Blacwell Publishing 2003; 17: 1-16.
49. Stane LC, Ulriksen J, Magnus P, Joner G. Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of type 1 diabetes in the offspring. *Diabetologia* 2000; 43: 1093-8.
50. Mc Dermentt M, Ramachandran A, Ogunkolade B et al. Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in indian Asians. *Diabetologia* 1997; 40: 971-5.
51. Pani M, Knapp M, Donner H et al. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 2000; 49: 504-7.
52. Guja C, Marshall S, Welsh K, Merriman M, Smith A, Todd JA. The study of CTLA-4 and vitamin D receptor polymorphisms in the Romanian type 1 diabetes population. *J Cell Mol Med.* 2002; 6: 75-81.
53. Crow MK. Costimulatory molecules and T-cell-B-cell interactions. *Rheum Dis Clin North Am.* 2004; 30(1): 175-91.
54. Roitt I. Autoimmunity and Autoimmune Disease. Roitt I, Brosstoff J, Male D (ed). *Immunology* 5th ed. Mosby, 1998; 28: 367-80.
55. Cooke A. Regulation of the Immune Response. Roitt I, Brosstoff J, Male D (ed). *Immunology* 5th ed. Mosby, 1998; 13: 171-85.
56. William E. Autoimmune Endocrinopathies. Stiehm RE, Ochs DH, Winkelstein AJ. *Immunologic Disorders in Infants & Children* 5th ed. Elsevier Saunders 2004; 37: 1179-95.

57. Feldmann M. Cell Cooperation in the Antibody Response.
Roitt I, Brosstoff J, Male D (ed). Immunology 5th ed. Mosby,
1998; 11: 139-42.
58. Kathy M, Graham G The role of CTLA-4 in the regulation of T
cell immune responses Immunology and Cell Biology 1999; 77:
1-10.
59. Kimura F, Gotoh M, Tanaka T, Luo Z, Miyazaki J, Uede T et
al. Locally expressed CTLA4-Ig in a pancreatic beta-cell line
suppresses accelerated graft rejection response induced by
donor-specific transfusion. Diabetologia 2002; 45: 831-40.
60. Chistiakov DA ,Savost'anov KV, Nosikov VV. CTLA4 gene
polymorphisms are associated with, and linked to, insulin-
dependent diabetes mellitus in a Russian population. BMC
Genetics 2001; 2: 6.
61. Lee YJ, Huang FY, Lo FS, Wang WC, Hsin Hsu C, Kao HA.
Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with type 1
diabetes in Chinese children. Clinical Endocrinology. 2000; 52:
153- 57.
62. Krokowski M, et al. CTLA-4 gene polymorphism is associated
with predisposition to IDDM in a population from central
Poland. Diabetes Metab. 1998; 24: 241-43.
63. Takara M, Komiya I, Kinjo Y, Tomoyose T. Association of
CTLA-4 Gene A/G Polymorphism in Japanese Type 1 Diabetic
Patients With Younger Age of Onset and Autoimmune Thyroid
Disease. Diabetes Care. 2000; 23: 975- 78.
64. Fajardy I, Vambergue A, Stuckens C, Weill J, Danze PM,
Fontaine P. CTLA-4 49 A/G dimorphism and type 1 diabetes
susceptibility: a French case-control study and segregation

- analysis. Evidence of a maternal effect. *Eur J Immunogenet.* 2002; 29: 251-57.
65. Osei-Hyiaman D, Hou L, Zhiyin R, Zhiming Z, Yu H, Amankwah AA, Harada S. Association of a novel point mutation (C159G) of the CTLA4 gene with type 1 diabetes in West Africans but not in Chinese. *Diabetes.* 2001; 50: 2169-71.
 66. Klitz W, Bugawan TL, Pabelo A, Solfelix CM, Buzzetti R, Pozzilli P, et al. Association of CTLA-4 variation with type I diabetes in Filipinos. *Immunogenetics.* 2002; 54: 310-13.
 67. Cinek O, Drevinek P, Sumnik Z, Bendlova B, Kolouskova S, Snajderova M et al. The CTLA4 +49 A/G dimorphism is not associated with type 1 diabetes in Czech children. *Eur J Immunogenet.* 2002; 29: 219-22.
 68. Mack R, Chowdary D, Samaan P, Podolak I, Dermody J. Prevalence of CTLA-4 polymorphism A49G in Ashkenazi Jews. *Genet Test* 2001; 5: 269.
 69. Ihara K, Ahmed S, Nakao F, Kinukawa N, Kuromaru R, Matsuura N et al. Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in the Japanese population. *Immunogenetics.* 2001; 53: 447-54.
 70. Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80: 41-45.
 71. Kristiansen O, Larsen Z, Pociot F. CTLA-4 in auto immune diseases - a general susceptibility gene to autoimmunity?. *Genes Immun* 2000; 1: 170-84.

72. Donner H, Braun J, Seidl C, Rau H, Finke R, Ventz M et al.
Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen
4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *J Clin
Endocrinol Metab.* 1997; 82(12): 41; 30-32.
73. Kouki T, Sawai Y, Gadrine CA, Fisfalen ME, Alegre ML,
DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in
exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and
contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol*
2000; 165: 606-11.
74. Heward JM, Allahabadia A, Armitage M, Hattersley A The
development of Graves' disease and the CTLA-4 gene on
chromosome 2q33. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 2398-
401.
75. Krokowski M, Bodalski J, Bratek A, Machejko P, Caillat,
Zucman S. CTLA-4 gene polymorphism is associated with
predisposition to IDDM in a population from central Poland.
Diabetes Metab. 1998; 24: 241-43.
76. Nithiyananthan R, Heward JM, Allahabadia A, Franklyn JA,
Gough SC. Polymorphism of the CTLA-4 gene is associated
with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom.
Thyroid. 2002; 12:3-6.
77. Chistiakov DA, Turakulov RI. CTLA-4 and its role in
autoimmune thyroid disease. *J Mol Endocrinol.* 2003; 1: 21-36.
78. Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, Jacob CO, Serrano-Rios
M, Martinez Larrad MT et al. Insulin-dependent diabetes
mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in
multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet.* 1997;6(8):1275-82.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ