



T.C.  
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

**TİP 2 DİYABETİN MİKROVASKÜLER  
KOMPLİKASYONUNDA İNFLAMATUAR HASARIN  
POTANSİYEL BİYOBELİRTEÇLERİ OLARAK  
İNAKTİF K VİTAMİNİ BAĞIMLI MATRİKS GLA  
PROTEİNLERİ VE FETUİN-A**

**JASIM AWAD ABDOUN ALNAYLEE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KIRŞEHİR/2022**



T.C.  
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

**TİP 2 DİYABETİN MİKROVASKÜLER  
KOMPLİKASYONUNDA İNFLAMATUAR HASARIN  
POTANSİYEL BİYOBELİRTEÇLERİ OLARAK  
İNAKTİF K VİTAMİNİ BAĞIMLI MATRİKS GLA  
PROTEİNLERİ VE FETUİN-A**

**JASIM AWAD ABDOUN ALNAYLEE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Zuhale ALİM**

**II. DANIŞMAN**  
**Dr. Öğr. Üyesi Anwar Jasib THAABAN**

**KIRŞEHİR / 2022**

“Tip 2 Diyabetin Mikrovasküler Komplikasyonunda İnflamatuvar Hasarın Potansiyel Biyobelirteçleri Olarak İnaktif K Vitamini Bağımlı Matriks Gla Proteinleri ve Fetuin-A” adlı bu çalışma 16.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

### **Tez Jürisi**

Doç. Dr. Zuhâl ALİM (Danışman)  
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi

Doç. Dr. Mine AKSOY  
Atatürk Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL  
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

**JASIM AWAD ABDOUN ALNAYLEE**



20.04.2022 tarihli Resmî Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



## ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans ders ve tez sürecimde sürekli desteği, sabrı, motivasyonu için Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi danışman hocam Sayın Doç. Dr. Zuhâl ALİM'a büyük bir içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca bu tez çalışmasında eş danışmanım olan Alqadisiyah Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Sayın Dr. Anwar Jasib THAABAN'a araştırmam boyunca değerli yorumları ve desteği için teşekkür ederim. Son olarak bu tezi araştırma ve yazma sürecim boyunca bana sürekli destek ve teşvik sağlayan aileme şükranlarımı sunarım.

Haziran, 2022

**JASIM AWAD ABDOUN ALNAYLEE**

# İÇİNDEKİLER

|                                                                             | Sayfa No |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------|
| ÖNSÖZ.....                                                                  | iv       |
| İÇİNDEKİLER.....                                                            | v        |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                                          | viii     |
| TABLO LİSTESİ.....                                                          | x        |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....                                              | xi       |
| ÖZET.....                                                                   | xii      |
| ABSTRACT .....                                                              | xiv      |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                        | <b>1</b> |
| 1.1. Amaç.....                                                              | 2        |
| <b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>                                              | <b>3</b> |
| 2.1. Diyabetes Mellitus (Şeker Hastalığı).....                              | 3        |
| 2.2. Diyabetes Mellitus'un Belirtiler .....                                 | 3        |
| 2.3. Diyabet İnsidansını Artıran Temel Faktörler .....                      | 4        |
| 2.4. Diyabetin Sınıflandırılması .....                                      | 5        |
| 2.4.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM).....                                 | 6        |
| 2.4.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM).....                                 | 6        |
| 2.4.3. Gestasyonel Diyabet .....                                            | 7        |
| 2.4.4. Spesifik Diyabet Türleri .....                                       | 8        |
| 2.5. Teşhis .....                                                           | 8        |
| 2.6. Diyabetin Patofizyolojisi .....                                        | 10       |
| 2.7. Diyabetes Mellitus'un Komplikasyonları .....                           | 11       |
| 2.7.1. Makrovasküler Komplikasyonlar .....                                  | 12       |
| 2.7.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar .....                                  | 12       |
| 2.7.3. Diyabetik Nefropati .....                                            | 13       |
| 2.7.4. Diyabetik Nöropati .....                                             | 14       |
| 2.7.5. Diyabetik Retinopati .....                                           | 14       |
| 2.8. Matriks Gla Protein (MGP) ve Tip 2 Diyabetes Mellitus .....            | 15       |
| 2.9. K Vitamini ve Tip 2 Diyabetes Mellitus .....                           | 16       |
| 2.10. Enflamasyon ve Tip 2 Diyabet .....                                    | 16       |
| 2.11. Fetuin A ve Tip 2 Diyabetes Mellitus .....                            | 16       |
| 2.12. Tip 2 Diyabetes Mellitus'ta Matris Metalloproteinazlar (MMP'ler)..... | 17       |
| 2.13. Tip 2 Diyabetes Mellitus'ta Tümör Nekroz Faktörü-alfa (TNF-α).....    | 17       |

|                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>                          | <b>19</b> |
| 3.1. Materyal .....                                         | 19        |
| 3.1.1. Ekipman ve Araçlar .....                             | 19        |
| 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler .....                    | 20        |
| 3.2. Metod .....                                            | 20        |
| 3.2.1. Çalışma Tasarımı .....                               | 20        |
| 3.2.2. Kan Örneklerinin Toplanması .....                    | 21        |
| 3.2.3. Biyokimyasal Analiz .....                            | 22        |
| 3.2.3.1. ELISA Ölçümleri .....                              | 22        |
| 3.2.3.2. Reaktif Hazırlama .....                            | 22        |
| 3.2.3.3. ELISA Prosedürü .....                              | 24        |
| 3.2.3.4. ELISA Sonuçlarının Hesaplanması .....              | 26        |
| 3.2.3.5. Glukoz Ölçümü .....                                | 27        |
| 3.2.3.6. Trigliseritlerin Ölçümü .....                      | 28        |
| 3.2.3.7. Kolesterol Ölçümü .....                            | 29        |
| 3.2.3.8. Üre/Bun (B.U) Ölçümü .....                         | 30        |
| 3.2.3.9. Kreatin Ölçümü .....                               | 31        |
| 3.2.3.10. HbA1c'nin Kantitatif Tayini .....                 | 31        |
| 3.3. İstatistiksel Analiz .....                             | 32        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                                    | <b>33</b> |
| 4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Genel Özellikleri .....   | 33        |
| 4.2. Biyokimyasal Değerlendirme .....                       | 34        |
| 4.3. Serum Fetuin Seviyeleri .....                          | 34        |
| 4.4. Serum TNF- $\alpha$ Seviyeleri .....                   | 35        |
| 4.5. Serum MMP-9 Seviyeleri .....                           | 36        |
| 4.6. Serum dp-ucMGP Seviyesi .....                          | 36        |
| 4.7. Serum K Vitamini Seviyeleri .....                      | 37        |
| 4.8. K Vitamini ve dp-ucMGP Arasındaki Korelasyon .....     | 38        |
| 4.9. dp-ucMGP ve Fetuin Arasındaki Korelasyon .....         | 39        |
| 4.10. dp-ucMGP ve TNF- $\alpha$ Arasındaki Korelasyon ..... | 40        |
| 4.11. dp-ucMGP ve MMP-9 Arasındaki korelasyon .....         | 41        |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>                           | <b>43</b> |
| 5.1. Biyokimyasal Değerlendirme .....                       | 43        |
| 5.2. Serum Fetuin-A Düzeyleri .....                         | 44        |
| 5.3. Serum TNF- $\alpha$ Düzeyleri .....                    | 44        |

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| 5.4. Serum MMP-9 Seviyesi .....       | 44        |
| 5.5. Serum dp-ucMGP Düzeyi .....      | 45        |
| 5.6. Serum K Vitamini Düzeyleri ..... | 46        |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                 | <b>47</b> |
| <b>EKLER .....</b>                    | <b>53</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                  | <b>57</b> |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1.</b> Diyabetes mellitusun sınıflandırılması (Ng, L. C. ve Gupta, M., 2020).....                                                                                                                                                                                                                                                            | 5  |
| <b>Şekil 2.2.</b> Tip 1 diyabet (Kapruwan, N., 2016). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 6  |
| <b>Şekil 2.3.</b> A: Tip 2 diyabet (Kapruwan, N., 2016), B: T2DM patogenezindeki evreler (Durruty, P. ve diğ., 2014).....                                                                                                                                                                                                                               | 7  |
| <b>Şekil 2.4.</b> T2DM'nin patofizyolojisi (Padhi, S. ve diğ., 2020) .....                                                                                                                                                                                                                                                                              | 11 |
| <b>Şekil 2.5.</b> Diyabetik mikrovasküler komplikasyonların ilerlemesinde genel yol (Das, A. K. ve diğ., 2019).....                                                                                                                                                                                                                                     | 13 |
| <b>Şekil 3.1.</b> Deneysel tasarım .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 21 |
| <b>Şekil 3.2.</b> dp-ucMGP ölçümü için standart çözeltinin hazırlanması .....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 23 |
| <b>Şekil 3.3.</b> TNF- $\alpha$ ölçümü için standart çözeltinin hazırlanması.....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 23 |
| <b>Şekil 3.4.</b> MMP-9 ölçümü için standart çözeltinin hazırlanması .....                                                                                                                                                                                                                                                                              | 23 |
| <b>Şekil 3.5.</b> K Vitamini ölçümü için standart çözeltinin hazırlanması.....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 24 |
| <b>Şekil 3.6.</b> Fetuin ölçümü için standart çözeltinin hazırlanması.....                                                                                                                                                                                                                                                                              | 24 |
| <b>Şekil 3.7.</b> ELISA cihazı ve çalışmada kullanılan bazı materyaller .....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 25 |
| <b>Şekil 3.8</b> ELISA plakaları .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 26 |
| <b>Şekil 3.9.</b> dp-ucMGP, TNF- $\alpha$ , MMP-9, K Vitamini ve Fetuin-A'nın ELISA tekniği ile elde edilen standart eğrileri. ....                                                                                                                                                                                                                     | 27 |
| <b>Şekil 3.10.</b> HbA1c'yi ölçmek için kullanılan Chroma HbA1c cihazı.....                                                                                                                                                                                                                                                                             | 32 |
| <b>Şekil 4.1.</b> T2DM, DN, DR, DNR hastaları ve kontrol gruplarında Serum Fetuin-A seviyeleri. * Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilir, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli farklılıkları belirtir ( $P < 0,05$ ). T2DM: Tip 2 diabetes mellitus, DN: Diyabetik nefropati, DR: Diyabetik Retinopati, DNR Diyabetik Nöropati.. ....       | 35 |
| <b>Şekil 4.2.</b> T2DM, DN, DR, DNR ve kontrol grubundaki hastalarda serum TNF- $\alpha$ seviyeleri. * Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilir, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli farklılıkları belirtir ( $P < 0,05$ ). T2DM: Tip 2 diabetes mellitus, DN: Diyabetik nefropati, DR: Diyabetik Retinopati, DNR: Diyabetik Nöropati.. .... | 35 |
| <b>Şekil 4.3.</b> T2DM, DN, DR, DNR ve kontrol grubundaki hastalarda serum MMP-9 seviyeleri. * Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilir, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli farklılıkları belirtir ( $P < 0,05$ ). T2DM: Tip 2 diabetes mellitus, DN: Diyabetik nefropati, DR: Diyabetik Retinopati, DNR: Diyabetik Nöropati. ....          | 36 |
| <b>Şekil 4.4.</b> T2DM, DN, DR, DNR ve kontrol grubundaki hastalarda serum dp-ucMGP seviyeleri. * Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilir, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli farklılıkları belirtir ( $P < 0,05$ ). T2DM: Tip 2 diabetes mellitus, DN: Diyabetik nefropati, DR: Diyabetik Retinopati, DNR: Diyabetik Nöropati .....       | 37 |
| <b>Şekil 4.5.</b> T2DM, DN, DR, DNR ve kontrol grubundaki hastalarda serum K vitamini seviyeleri. * Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilir, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli farklılıkları belirtir ( $P < 0,05$ ). T2DM: Tip 2 diabetes mellitus, DN: Diyabetik nefropati, DR: Diyabetik Retinopati, DNR: Diyabetik Nöropati. ....     | 38 |
| <b>Şekil 4.6.</b> Hasta gruplarında K vitamini ve dp-ucMGP arasındaki korelasyon. ....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 39 |

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.7.</b> Hasta gruplarında fetuin-A ve dp-ucMGP arasındaki korelasyon .....     | 40 |
| <b>Şekil 4.8.</b> Hasta gruplarında TNF- $\alpha$ ve dp-ucMGP arasındaki korelasyon..... | 41 |
| <b>Şekil 4.9.</b> Hasta gruplarında MMP-9 ve Dp-ucMGP arasındaki korelasyon .....        | 42 |



## TABLO LİSTESİ

Sayfa No

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 3.1.</b> Çalışmada kullanılan araç ve gereçler .....                                                  | 19 |
| <b>Tablo 3.2.</b> Çalışmada kullanılan kitler .....                                                            | 20 |
| <b>Tablo 4.1.</b> Hasta ve kontrol gruplarının genel özellikleri .....                                         | 33 |
| <b>Tablo 4.2.</b> Çalışma gruplarında klinik, biyokimyasal ve hemodinamik değişkenlerin karşılaştırılması..... | 34 |
| <b>Tablo 4.3.</b> Hasta gruplarında dp-ucMGP ile diğer biyobelirteçler arasındaki korelasyon .                 | 42 |



## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

| Simgeler                      | Açıklama                     |
|-------------------------------|------------------------------|
| %                             | : Yüzde                      |
| °C                            | : Santigrat derece           |
| dL                            | : Desilitre                  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : Su                         |
| kg                            | : Kilogram                   |
| L                             | : Litre                      |
| mg                            | : Miligram                   |
| ng/mL                         | : Mililitre başına nano gram |
| O <sub>2</sub>                | : Oksijen                    |
| µL                            | : Mikrolitre                 |

| Kısaltmalar | Açıklama                                          |
|-------------|---------------------------------------------------|
| AHSG        | : Heremans-Schmid glikoprotein                    |
| Alb         | : Albümin                                         |
| BU          | : Kan üre                                         |
| DM          | : Diyabetes Mellitus                              |
| DN          | : Diyabetik Nefropati                             |
| DNR         | : Diyabetik Nöropati                              |
| ELISA       | : Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi            |
| dp-ucMGP    | : Defosfo-karboksilatlanmamış Matriks Gla Protein |
| DR          | : Diyabetik Retinopati                            |
| FBS         | : Açlık kan şekeri                                |
| FPG         | : Açlık Plazma Glukozu                            |
| GDM         | : Gestasyonel Diyabetes Mellitus                  |
| Glu         | : Glutamik Asit                                   |
| GLUT        | : Geçiş Kolaylaştırıcı Glukoz Taşıyıcısı          |
| HbA1c       | : Hemoglobin A1c                                  |
| HRP         | : Yabanturpu Peroksidaz                           |
| IDDM        | : İnsüline Bağımlı Şeker Hastalığı                |
| IR          | : İnsülin Direnci                                 |
| MGP         | : Matriks Gla Protein                             |
| MMP-9       | : Matriks Metalloproteinaz                        |
| NIDDM       | : İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet                |
| OGTT        | : Oral Glukoz Tolerans Testleri                   |
| SGLT        | : Sodyum ve Glukozun Yardımcı Taşıyıcısı          |
| S.Cr        | : Serum Kreatinin                                 |
| WHO         | : Dünya Sağlık Örgütü                             |
| T1DM        | : Tip 1 Diyabetes Mellitus                        |
| T2DM        | : Tip 2 Diyabetes Mellitus                        |
| TC          | : Toplam Kolesterol                               |
| TG          | : Trigliserit                                     |
| TNF-α       | : Tümör Nekroz Faktörü Alfa                       |
| TMB         | : Tetrametilbenzidin                              |

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# **TİP 2 DİYABETİN MİKROVASKÜLER KOMPLİKASYONUNDA İNFLAMATUAR HASARIN POTANSİYEL BİYOBELİRTEÇLERİ OLARAK İNAKTİF K VİTAMİNİ BAĞIMLI MATRİKS GLA PROTEİNLERİ VE FETUİN-A**

**Jasim Awad Abdoun ALNAYLEE**

**Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Zuhail ALİM**

**II. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Anwar Jasib THAABAN**

Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM) hastalarında vasküler kalsifikasyon mekanizmaları ile mortalite ilişkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Arteriyel kalsifikasyonlar ve sertlik gibi makrodolaşım özellikleri, K vitamini durumunun biyolojik belirteci olarak kabul edilen dolaşımdaki defosfo-karboksilatlanmamış Matris Gla Proteinini (dP-ucMGP) ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek plazma dP-ucMGP konsantrasyonları, düşük K vitamini durumunu gösterir ve vasküler kalsifikasyonla ilişkilidir. Hiperglisemi, diyabetik vasküler komplikasyonların ve inflamatuvar yanıtın gelişimi için itici güçtür. Fetuin-A, dolaşımdaki kalsiyum ve fosfor ile etkileşime girerek çözünürlüklerini artırır. Sonuç olarak, arterlerdeki kalsiyum birikimi azalır. Arter kalsifikasyonu, T2DM'de vasküler hastalığın ayırt edici özelliğidir. Bu çalışmada, T2DM'nin mikrovasküler komplikasyonları olan hastalarda inaktif form dP-ucMGP'nin serum düzeylerini ve bunun K vitamini ve inflamatuvar yanıt ile ilişkisini araştırmak amaçlandı. Bu çalışmaya toplam 160 T2DM hastası dahil edildi. Bu hastalar her biri 40 hastadan oluşan dört gruba ayrıldı. Bu gruplar şu şekildeydi: Mikrovasküler komplikasyonu olmayan 40 T2DM hastası (T2DM, n=40), diyabetik nefropatisi olan 40 T2DM hastası (DN, n=40), diyabetik retinopatisi olan 40

T2DM hastası (DR, n=40), ve diyabetik nöropatisi olan 40 T2DM hastası (DNR, n=40). Kontrol grubu olarak 40 sağlıklı birey kullanıldı. Tüm gruplarda dP-ucMGP, K vitamini, fetuin-A, Tümör Nekroz Faktörü Alfa (TNF- $\alpha$ ) ve matriks metalloproteinaz (MMP-9) seviyeleri ELISA ile ölçüldü. DNR'si olan hastalarda Fetuin-A ve TNF- $\alpha$  düzeyleri anlamlı olarak yüksekti ( $P<0,05$ ). MMP-9 seviyeleri, kontrole kıyasla T2DM'li hastalarda önemli değişiklikler gösterdi ( $P\leq 0,05$ ). Ayrıca sonuçlar, diğer hasta grupları ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DNR'li hastalarda (dP-ucMGP) ve K vitamini düzeylerinde önemli bir düşüşün olduğu görüldü ( $P< 0,05$ ). Bu çalışmada DNR hastalarında dp-ucMGP ve K vitamini arasında güçlü bir negatif korelasyon bulundu. Sonuç olarak, T2DM'de azalmış dp-ucMGP ve K vitamini seviyeleri, mikrovasküler komplikasyonlar ve inflamatuvar yanıt ile ilişkilidir. Bu nedenle dp-ucMGP, T2DM vasküler komplikasyonlarında umut verici bir biyobelirteç veya terapötik hedef olarak görülebilir.

Haziran 2022, 57 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** T2DM, Mikrovasküler komplikasyonlar, Fetuin-A, dp-ucMGP, K Vitamini

## **ABSTRACT**

**M.Sc. THESIS**

# **INACTIVE VITAMIN K–DEPENDENT MATRIX GLA PROTEINS and FETUIN-A as POTENTIAL BIOMARKERS of INFLAMMATORY DAMAGE in MICROVASCULAR COMPLICATION of TYPE2 DIABETES**

**Jasim Awad Abdoun ALNAYLEE**

**Kirsehir Ahi Evran University**

**Graduate School of Sciences and Engineering**

**Department of Chemistry**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zuhail ALIM**

**II. Supervisor: Assist. Prof. Dr. Anwar Jasib THAABAN**

The relationship between vascular calcification mechanisms and mortality in patients with Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is not fully understood. Macrocirculatory features such as arterial calcifications and stiffness have been associated with circulating dephospho-carboxylated Matrix Gla Protein (dP-ucMGP), which is considered a biomarker of vitamin K status. High plasma dp-ucMGP concentrations indicate low vitamin K status and are associated with vascular calcification. Hyperglycemia is the driving force for the development of diabetic vascular complications and the inflammatory response. Fetuin-A interacts with circulating calcium and phosphorus, increasing their solubility. As a result, calcium deposition in the arteries is reduced. Arterial calcification is the hallmark of vascular disease in T2DM. In this study, it was aimed to investigate serum levels of inactive form dP-ucMGP and its relationship with vitamin K and inflammatory response in patients with microvascular complications of T2DM. A total of 160 T2DM patients were included in this study. These patients were divided into four groups of 40 patients each. These groups were as follows: 40 T2DM patients without microvascular complications (T2DM, n=40), 40 T2DM patients with diabetic nephropathy (DN, n=40), 40 T2DM patients with diabetic retinopathy (DR, n=40), and diabetic neuropathy 40 patients with T2DM (DNR, n=40). Forty healthy individuals were used as the control group. dP-ucMGP,

vitamin K, fetuin-A, Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) and matrix metalloproteinase (MMP-9) levels were measured by ELISA in all groups. Fetuin-A and TNF- $\alpha$  levels were significantly higher in patients with DNR ( $P < 0,05$ ). MMP-9 levels showed significant changes in patients with T2DM compared to control ( $P \leq 0,05$ ). In addition, when the results were compared with the other patient groups and the control group, there was a significant decrease in DNR (dp-ucMGP) and vitamin K levels ( $P < 0,05$ ). In this study, a strong negative correlation was found between dp-ucMGP and vitamin K in DNR patients. In conclusion, decreased dp-ucMGP and vitamin K levels in T2DM are associated with microvascular complications and inflammatory response. Therefore, dp-ucMGP may appear as a promising biomarker or therapeutic target in T2DM vascular complications.

June 2022, 57 Pages

**Keywords:** T2DM, Microvascular complications, Fetuin-A, dp-ucMGP, Vitamin K

## 1. GİRİŞ

Yüksek kan şekeri seviyeleri ve anormal karbonhidrat, protein ve lipit metabolizması, diyabetes mellitus (DM)'u karakterize eder. Diyabet, yetersiz insülin üretimi veya etkinliği veya her ikisinin bir kombinasyonu ile ortaya çıkar. Esasen, pankreasın beta hücreleri tükenebilir, bu da insülinin etkinliğinde bir azalmaya ve etkilerine karşı bir dirence yol açabilir. T2DM'nin hem kısa hem de uzun vadeli yansımaları vardır ve bu durum her iki diyabet türünün de hastalanıp ölmesinin başlıca nedeni olan vasküler ağacı doğrudan ve dolaylı olarak etkiler. Diyabetik nefropati, retinopati, nöropati, inme, kardiyovasküler hastalıklar diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarıdır (Fowler, M.J., 2011).

Glutamik Asit Matriks Proteini (dP-ucMGP) ilk olarak kemik dokusunda keşfedilmiş olup kondrositlerde, damar düz kas hücrelerinde, endotel hücrelerinde, nöronlarda ve glial hücrelerde bulunur (Borrás, T. ve diğ., 2015). dP-ucMGP beşi glutamik asit (Glu), üçü serin olmak üzere 84 amino asit kalıntısına sahiptir. Aktif ve pasif olmak üzere iki formu mevcuttur (Jeannin, A. ve diğ., 2020). Glutamik asit kalıntıları gama-glutamil karboksilasyona, serin kalıntıları fosforilasyona uğrar ve bunların her ikisi de K vitaminine bağlıdır (Dalmeijer, G.W. ve diğ., 2012). Yapılan çalışmalarda vasküler kalsifikasyonlar ve sertlik dolaşımdaki dP-ucMGP ile ilişkilendirilmiştir. Bireyler ve gruplar üzerinde yapılan uzun vadeli çalışmalar, plazma dP-ucMGP'nin mortalite ve olumsuz kardiyovasküler olayların bir belirtici olduğunu göstermiştir. Ayrıca çok sayıda çalışma, MGP'nin sinir sisteminde bir rolü olduğunu öne sürmektedir (Wei, F.F. ve diğ., 2018).

Fetuin-A, vücutta karaciğerden dolaşıma salınır. Fetuin-A dolaşımdaki kalsiyum ve fosforun daha kolay çözünmesini sağlar (Weikert, C. ve diğ., 2008), Böylece arterlerdeki kalsiyum birikintileri azaltır. Fetuin-A tarafından insülin sinyallemesinin inhibisyonu, insülin reseptör bağlanması yoluyla sağlanır (Srinivas, P.R. ve diğ., 1993). Trigliseritler, LDL kolesterol, vücut kitle indeksi (VKİ) ve insülin direnci, seviyeleri daha yüksek olanlarda Fetuin-A seviyesi daha yüksektir (Ix, J.H. ve diğ., 2006). Bu tez çalışmasında T2DM'nin mikrovasküler komplikasyonunda inflamatuvar hasarın potansiyel

biyobelirteçleri olarak inaktif K vitamini bağımlı matriks gla proteinleri ve fetuin-A araştırılmıştır.

### **1.1. Amaç**

1. T2DM'nin mikrovasküler komplikasyonları olan hastalarda aktif olmayan MGP formunun (defosfo-karboksilatlanmamış MGP (dP-ucMGP)) düzeylerini araştırmak.
2. T2DM'nin mikrovasküler komplikasyonlarının K vitamini düzeyleri ve arteriyel kalsifikasyonla ilişkisini belirlemek.
3. T2DM'nin mikrovasküler komplikasyonları sırasında fetuin-A düzeylerini ve bunun dp-ucMGP bağlantılı inflamasyonla ilişkisini araştırmak.
4. T2DM'nin mikrovasküler komplikasyonlarında dP-ucMGP rolünü göstermek.

## **2. GENEL KISIMLAR**

### **2.1. Diyabetes Mellitus (Şeker Hastalığı)**

Diyabetes mellitus (DM), uygun olmayan glukoz, protein ve lipit metabolizmasının yanı sıra yüksek kan şekeri seviyeleri ile işaretlenmiş metabolik bir hastalıktır. Diyabet, insülin sentezi eksikliğinden, insülin eksikliğinin sonuçlarından veya ikisinin kombinasyonundan kaynaklanır.

Diyabet, pankreasın insülin üretememesi veya vücut hücrelerinin insüline tepki verememesinden kaynaklanır. Şiddetli hiperglisemi, sık idrara çıkma, polidipsi, kilo kaybı ve bazen aşırı yeme durumuna ve görme kaybına neden olur. Hastalar çok çeşitli belirti ve semptomlar gösterdiğinden, diyabet önceden varsayıldığından daha karmaşık bir hastalıktır. Şu anda tip 1 diyabeti önlemek için bilinen bir teknik yoktur. Tüm vakaların yüzde 85-90'ını oluşturan tip 2 diyabet, sağlıklı vücut ağırlığının korunması, sık egzersiz yapılması ve besleyici bir diyetin tüketilmesiyle önlenebilir veya geciktirilebilir Uluslararası Diyabet Federasyonu'na göre, 2015 yılında dünya çapında 415 milyondan fazla insan diyabet hastasıydı ve 2040 yılına kadar bu sayının 640 milyona ulaşacağı öngörülmüyor. Diyabetlilerin yarısının hastalıkları hakkında bilgi sahibi olmaması, diyabetin gelişme riskini artırmaktadır.

### **2.2. Diyabetes Mellitus'un Belirtileri**

Diyabet, hiçbir belirti göstermemek de dahil olmak üzere çeşitli şekillerde kendini gösterebilir. Sık idrara çıkma (ürinasyon), aşırı susama (polidipsi), yorgunluk, kilo kaybı, halsizlik, odaklanma eksikliği, kaşıntı ve kızarıklık, yaygın semptomlardır. Diyabet ayrıca titreme, ellerde ve ayaklarda zayıf hareket kabiliyeti, görme bozukluğu, baş ağrıları, değişen enfeksiyonlar, orta derecede yara iyileşmesi, mide rahatsızlığı, şişkinlik, ve ayrıca bulanık ve zayıf görme ile bağlantılıdır (Li, H. ve diğ., 2011). Uygun tedavi mevcut değilse, ketoasidoz veya ketojenik olmayan hiperosmolar durum, koma ve ölümle sonuçlanabilir. Birçok organ, diyabetin bir sonucu olarak uzun süreli hasar ve işlev bozukluğuna uğrar. Böbrek yetmezliği, kardiyovasküler hastalık, periferik vasküler

hastalık, serebrovasküler hastalık, retinopati ve nefropati, diyabetin uzun vadeli komplikasyonlarıdır.

### 2.3. Diyabet İnsidansını Artıran Temel Faktörler

Diyabet, dünya çapında artan prevalansı nedeniyle bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Hastalığın ortaya çıkışı çok sayıda risk faktöründen etkilenir. Çeşitli nedenler (örneğin; genetik, çevresel faktörler, insülin sentezinin çok erken evrelerinin kaybı gibi) sonucunda insülin direnci ortaya çıkabilir. Prediyabet ve diyabet için risk faktörleri arasında hiperinsülinemi, dislipidemi, azalmış hücre duyarlılığı ve artmış glukagon aktivitesi bulunur (Akter, S. ve diğ., 2017). Her iki durumda da, bu değişkenlerin insülin direnci veya insülin disfonksiyonu gelişiminde önemli bir rolü olduğu görülmektedir (Sears, B., ve Perry, M., 2015). Diyabet için bazı risk faktörleri aşağıda açıklanmıştır:

**Aile Öyküsü:** Tip 2 diyabetin güçlü bir kalıtsal bağlantısı olduğundan, tip 2 diyabetten etkilenen akrabalara (özellikle birinci derece akrabalara) sahip olmak, diyabet edinme riskini önemli ölçüde artırır. Diyabetlilerin yaklaşık %25'inin aile öyküsünde bu durum vardır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda genlerin tip 2 diyabetin ilerlemesinde önemli bir rolü olduğu tespit edilmiştir (Olokoba, A.B. ve diğ., 2012).

**Obezite:** Obezite ve egzersiz eksikliği, yaşam tarzı hastalığı olarak da bilinen tip 2 diyabetin en yaygın belirtilerinden ikisidir. Obezite çoğunlukla fiziksel aktivite eksikliğinden kaynaklanır ve karaciğer, kas ve yağ dokusu gibi insülin hedefli organlarda insülin direnci (IR) ile bağlantılıdır. IR, vücudun uygun insülin seviyelerine tepki vermemesi ve bunun sonucunda kan şekeri kontrol sorunlarına yol açması olarak tanımlanır. Sonuç olarak obezite ve kronik IR, tip 2 diyabetin gelişiminde rol oynar. Tip 2 diyabetin gelişimi, bir dizi yaşam tarzı faktörü ile ilişkilendirilmiştir. Hareketsiz bir yaşam tarzı ve sigara içmek bunlara örnektir. Obezitenin tip 2 diyabet hastalarının yaklaşık yüzde 55'inin nedeni olduğu düşünülmektedir (Olokoba, A.B. ve diğ., 2012). Son yıllarda tip 2 diyabetin artışı, büyük ölçüde dünya nüfusunun aşırı kilolu insan oranındaki artışla bağlantılıdır (Amerikan Diyabet Derneği, 2018).

**Yaş:** Glukoz intoleransı diyabet öncesi ve tip 2 diyabette yaşla birlikte artar. Yaşlanma insülin duyarlılığını azaltır ve artan insülin direnci karşısında yetersiz beta hücre fonksiyonunu değiştirir veya telafi eder. Ayrıca, vücut kütleindeki azalma ve vücut yağındaki, özellikle visceral adipositlerdeki artış, yaşa bağlı insülin direncine katkıda

bulunabilir. Yaşlılarda mitokondriyal aktivite yaşla birlikte azaldığında insülin direnci gelişir (Chia, C.W. ve diğ., 2018).

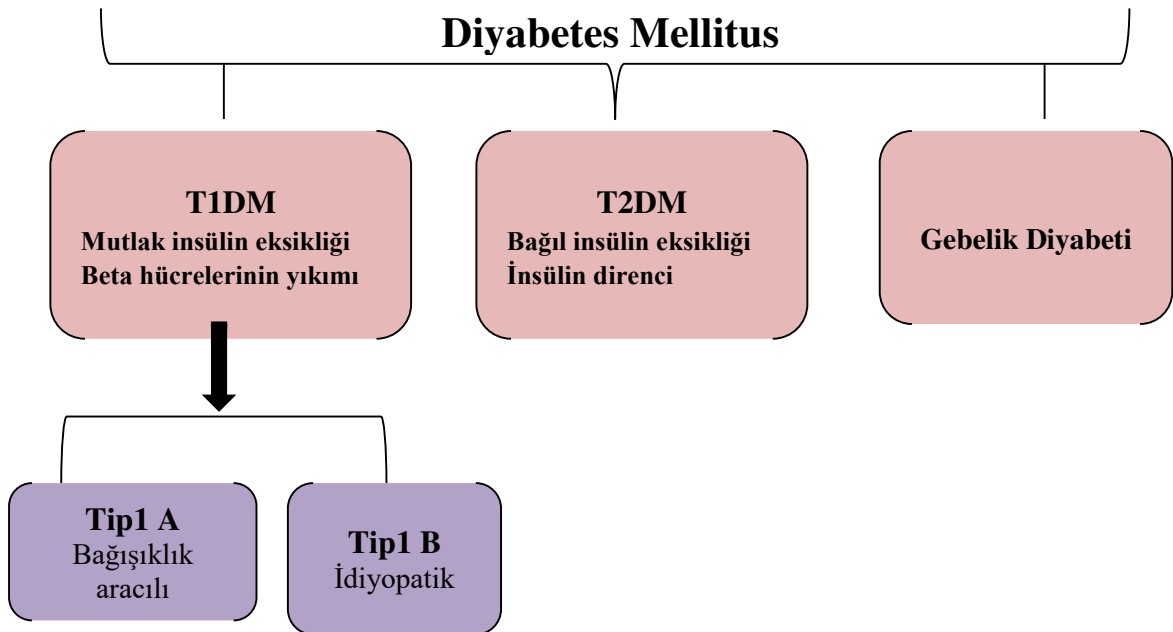
**İlaçlar:** Steroidler, antibiyotikler (florokinolonlar), kolesterol düşürücü ilaçlar (niasin) ve doğum kontrol hapları diyabet gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Tosur, M. ve diğ., 2020).

**Stres:** Stres zamanlarında hormonlar, insülinin doğru şekilde hareket etmesini engelleyerek kan şekeri konsantrasyonunun yükselmesine neden olabilir (Wong, H. ve diğ., 2019).

**Hamilelik:** İnsülin aktivitesi, hamilelik sırasında üretilen hormonlar tarafından engellenebilir. Pankreastaki beta hücrelerinden artan insülin üretimi, gestasyonel diyabetli kadınlarda insülin direncini yenemez. Bozulmuş insülin duyarlılığından sorumlu anahtar değişkenler, kortizol ve progesteronun yanı sıra plasental hormonları içerir (Amerikan Diyabet Derneği, 2018).

## 2.4. Diyabetin Sınıflandırılması

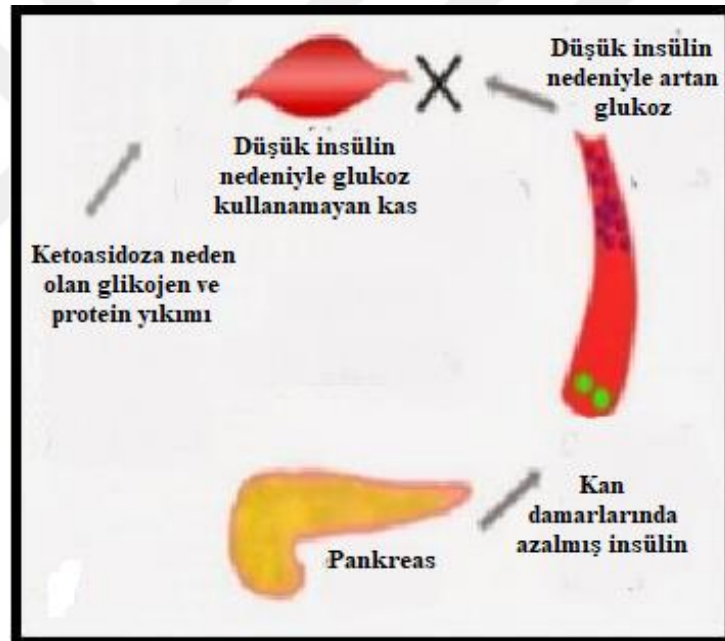
Diyabet, tüm dünyadaki insanları etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur (Kandhasamy, J.P., ve Balamurali, S., 2015). Dört ana diyabetes mellitus türü vardır (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Diyabetes mellitusun sınıflandırılması (Ng, L.C., ve Gupta, M., 2020).

#### 2.4.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM)

T1DM, insüline bağımlı diyabet (IDDM) veya juvenil diyabet olarak adlandırılır (Şekil 2.2). Çocuklarda 15 yaş altı T1DM, diyabetin en yaygın şeklidir (Diaz-Valencia, P.A. ve diğ., 2015). T1DM diyabetli tüm bireylerin %10-15'ini oluşturur. İmmün aracılı  $\beta$  hücre yıkımı, insülin eksikliği ve hiperglisemiye yol açan T1DM'a neden olur (Weikert, C. ve diğ., 2008). T1DM'da antiglutamik asit, adacık hücresi ve insülin dekarboksilaz antikorları dahil olmak üzere çeşitli otoimmün mekanizmalar keşfedilmiştir (Baynest, H.W., 2015). İnsülin üreten pankreas hücreleri, T1DM'da pankreasın kendi bağışıklık sistemi tarafından yok edilir. İnsülin kan şekeri seviyelerini düzenlediğinden, diyabete yol açabilecek beta hücre ölümü süreçlerini ve hayatta kalmak için insülin gerekliliğini ifade eder (Ifeanyi, O.E., 2015). Tip 1 diyabette pankreas ya yeterli insülin üretmez ya da hiç insülin üretmez (Berezin, A.E., 2016).



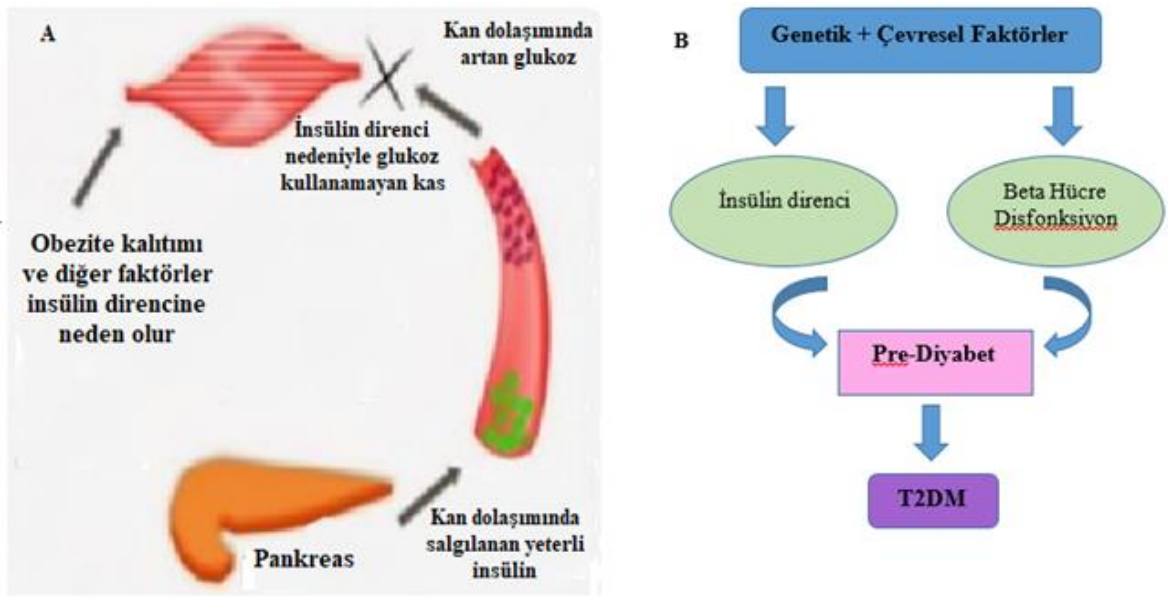
Şekil 2.2. Tip 1 diyabet (Kapruwan, N., 2016).

#### 2.4.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM)

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM), yetişkin başlangıçlı diyabet veya insüline bağımlı olmayan diyabet olarak da bilinir. Kilo alımı, egzersiz eksikliği, kötü beslenme ve yaşlanma, tip 1 diyabetli kişilerde yüksek kan şekeri seviyelerine katkıda bulunan faktörlerdir (Imamura, F. ve diğ., 2015). Bununla birlikte T2DM'da vücut hücreleri insüline ya yetersiz yanıt verir ya da insülini yeterince oluşturamaz. T2DM'da insülin sentezi azalır, bu da glukoz, lipid ve protein metabolizmasında anormalliklere neden olur

(DeFronzo, R.A. ve diğ., 2015). Genellikle "yetişkin başlangıçlı diyabet" veya "insüline bağımlı olmayan diyabet" olarak bilinen T2DM, tüm diyabet oluşumlarının %90-95'inden sorumludur. Bu kategoride periferik kan damarlarında insülin yetmezliği ve insülin direnci olan kişiler bulunur.

Tip 2 diyabetli kişilerin büyük çoğunluğu, aşırı kilolu veya obezdir. Fazla kilo insülin direncini şiddetlendirir (DeFronzo, R.A. ve diğ., 2015; Umpierrez, G., ve Korytkowski, M., 2016). T2DM, Şekil 2.3'de görüldüğü gibi genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile üretilir. Sonuç olarak hem periferik dokularda hem de pankreas hücrelerinde insülin disfonksiyonu meydana gelir (Taylor, R., 2013).



**Şekil 2.3. A:** Tip 2 diyabet (Kapruwan, N., 2016), **B:** T2DM patogenezindeki evreler (Durruty, P. ve diğ., 2014).

#### 2.4.3. Gestasyonel Diyabet

Gebeyken diyabete yakalanan kadınlar, patofizyolojik bir hastalıktan çok fonksiyonel bir kategorizasyon olan gestasyonel diyabetes mellitus (GDM) olarak sınıflandırılmaktadır. T1DM edinen veya gebelikleri sırasında saptanmamış asemptomatik T2DM bulunan gebelerin GDM olduğu söylenir. Durum, gebeliğin üçüncü trimesterinde kendini gösterir (Baynest, H.W., 2015). GDM, pankreasın beta hücrelerinin gebelik sırasında ortaya çıkan

artan insülin talebine yeterli yanıt vermemesine bağlı olarak değişen derecelerde hiperglisemi ile karakterizedir (Catalano, P. M., 2014).

Gebeliğin 24. haftasında GDM insidansı en yüksektir. Bir önlem olarak, gestasyonel diyabet geliştirme riski yüksek olan hamile kadınlar, ikinci ve üçüncü trimesterde oral glukoz tolerans testi yaptırmalıdır. Hamilelik sırasında hiperglisemi, yüksek tansiyonu ve makrozomisi olan kadınlar için zor ve tehlikeli bir vajinal doğum riskini artırır. İnsülin veya başka bir oral diyabet ilacı, duruma göre doktor tarafından reçete edilebilir. Daha önce gebelikleri sırasında gestasyonel diyabet geçirmiş olan kadınların, durum normal olarak doğumdan sonra ortadan kalkmasına rağmen, gelecekte tip 2 diyabete yakalanmaları daha yaygındır. GDM annelerinden doğan ergenler ve genç yetişkinlerin T2DM edinme riski daha yüksektir (Amerikan Diyabet Derneği, 2015).

#### **2.4.4. Spesifik Diyabet Türleri**

Bilinen çeşitli etiyolojilere sahip diyabetes mellitus tipleri, "Diğer Spesifik Tipler" olarak bilinen kategorizasyonu oluşturacak şekilde toplanmıştır. Bu kategori, beta hücre aktivitesinde kalıtsal anormallikleri veya insülin eylemsizliğinde kusurları olanları içerir. Kistik fibroz veya pankreatit gibi pankreas ekzokrin bozuklukları olan kişiler; endokrinopatilerle ilişkili pankreas işlev bozukluğu olan kişiler (örn. akromegali); veya DM'nin %10'undan daha azını oluşturan ilaç enfeksiyonları veya kimyasalların neden olduğu pankreasta işlev bozukluğu olan kişiler bu kategoridedir (Berezin, A.E., 2016).

#### **2.5. Teşhis**

Kontrolsüz diyabet ciddi sonuçlara yol açabileceğinden, durumun erken tespiti komplikasyon riskini azaltmaya yardımcı olabilir. Sürekli olarak yükselen kan şekeri seviyeleri, sık idrara çıkma, artan susuzluk ve artan iştah, diyabetin göstergeleridir. Prediyabet veya diyabeti tespit etmek için düzenli olarak çeşitli biyokimyasal testler yapılır. Bu testler aşağıda sıralanmıştır.

- 1. Açlık Plazma Glukozu (FPG) Testi:** En az 10 saat açlık sonrası test yapılır. Açlık glukoz seviyesi 126 mg/dL'ye (7.0 mmol/L) eşit veya daha fazla ise diyabet teşhisi konulabilir. Diyabet, semptomların fiziksel muayenesine ek olarak bu test kullanılarak tespit edilirken, rastgele glukoz izleme, test edilen kişinin en son ne zaman yediğine

bakılmaksızın kan şekerini düşürür. Şeker hastalarında glukoz seviyeleri genellikle 7,0 mmol/L civarında seyreder. 75 g glukoz alımından iki saat sonra, bozulmuş glukoz toleransı olan bir kişinin plazma glukoz seviyesi 7.8 mmol/L olur (Siu, A.L., 2015).

2. **Oral glukoz tolerans testleri (OGTT):** Oral glukoz tolerans testi (OGTT), prediyabet, gestasyonel diyabet ve insülin direncini saptamak ve ayrıca T2DM taraması yapmak için kullanılabilir. Glukoz tolerans testi, WHO'nün herkes için tavsiye ettiği 75 gramlık bir oral dozu simüle eder. Gençlerde, dozaj yalnızca kiloya göre değiştirilir. Vücudun bir yemekten sonra glukozu nasıl yönettiğini belirlemek için vücudun şekere tepkisini inceler (Arslanian, S.A. ve diğ., 2018). OGTT testi, belirli bir miktar şeker tüketildiğinde vücut hücrelerinin glukozu ne kadar iyi emdiğini ölçer. Şüpheliye genellikle ağızdan 75 gram glukoz verilir ve iki saat sonra plazma glukoz seviyesi ölçülür. Bir diyabetik, kan şekeri seviyesi 11.1 mmol/L veya daha yüksek olan bir kişi olarak tanımlanır (Alam, S. ve diğ., 2021).
3. **Glikozillenmiş Hemoglobin (HbA1c):** Eritrositlerin 120 günlük bir ömrü olduğu için, glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c) sıklıkla diyabeti belirlemek için ek bir test olarak kullanılır. Diyabet yeterince yönetiliyorsa, mevcut kılavuzlara göre en az altı ayda bir HbA1c kontrol edilmelidir. Diyabetli olmayan bireylerde HbA1c seviyeleri %4-5.6 arasında değişir ve pre-diyabetlilerde HbA1c seviyesi %5.7 ile %6.4 arasındadır. %6.4 ve üzerinde HbA1c seviyesine sahip olanlar ise diyabetlidir (Sherwani, S.I. ve diğ., 2016). HbA1c'yi diyabet teşhisi için kullanırken, bunun yalnızca ortalama kan şekeri düzeylerinin dolaylı bir ölçüsü olduğu ve yaş, ırk/etnik köken, anemi / hemoglobinopati ve hemoglobin glukoz düzeylerini etkileyebilecek diğer faktörlerin hesaba katılmadığı unutulmamalıdır (Amerikan Diyabet Derneği, 2018). Bir kişinin diyabet tanısını doğrulamak için çeşitli günlerde farklı testler yapılabilir.
4. **İdrar Testi:** Diyabetik idrar testi de bir diğer tanı yöntemidir. Normal idrar az miktarda glukoz içerir. Güvenli kabul edilmesi için idrardaki glukoz seviyeleri 0 ile 0.8 mmol/L arasında olmalıdır (100 ml'de yaklaşık 2 ila 20 mg glukoz). Glukozüri, idrarın aşırı miktarda glukoz içerdiği bir durumdur. İdrardaki glukoz miktarı, kandaki glukoz seviyeleri ile belirlenir (Pihoker, C. ve diğ., 2018).

## 2.6. Diyabetin Patofizyolojisi

Diyabet sorunlarına yol açan birkaç karmaşık yol vardır. Hastalığın gelişimi, oksidatif stres ve inflamasyondaki artışla bağlantılı gibi görünmektedir (Pickering, R.J. ve diğ., 2018). Artan oksidatif stres, iltihaplanma ve zayıflamış bağışıklık savunmaları, aşırı kilolu veya diyabetik olmanın yan etkileridir. Vazokonstriksiyon ve vazodilatasyonun yanı sıra fibrinolitik sistemi kontrol eden değişkenler bu durumdan etkilenebilir (Lotfy, M. ve diğ., 2016).

İnsülin direnci karaciğerde glukoz sentezini artırarak daha fazla serbest yağ asidini erişilebilir hale getirerek patofizyolojiye katkıda bulunur (Forbes, J.M., ve Cooper, M.E., 2013). Vücudun glukoz homeostazı çeşitli hormonlar tarafından düzenlenir. Öte yandan, glukoz homeostazı insülin ve glukagona bağlıdır (Okur, M.E. ve diğ., 2017). Hücreler, kan şekeri seviyeleri arttığında insülin üretir. Kan glukoz seviyeleri, insülinin karaciğerdeki glikojenoliz ve glukoneogenez üzerindeki etkilerinin yanı sıra karaciğer, kas ve yağdaki glukoz Emilimi üzerindeki etkileri yoluyla düşürülür (Mayorov, A.Y., 2011).

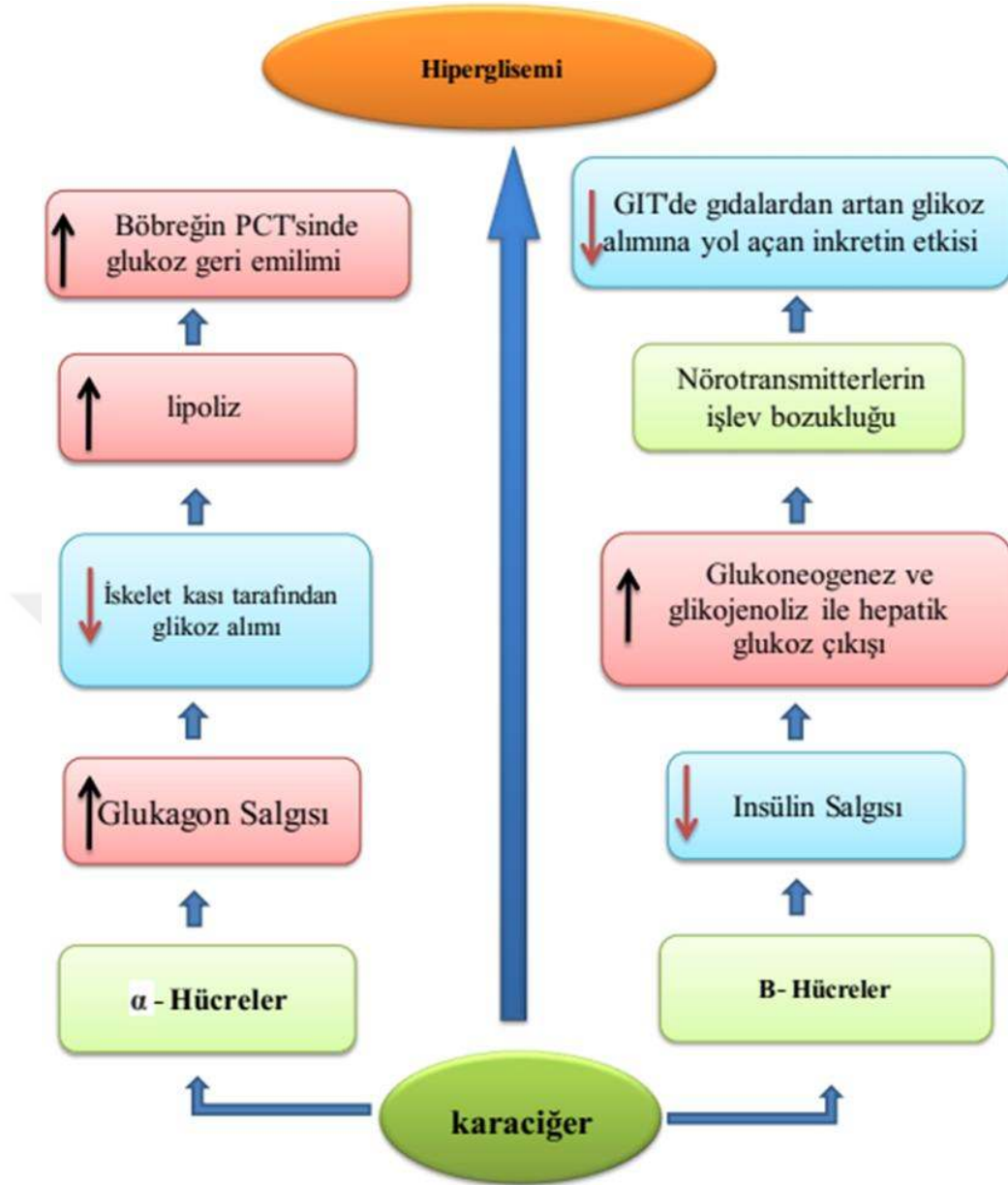
Kan şekeri seviyeleri düşük olduğunda, pankreas hücreleri glukagon üretir. Karaciğerde, glikojenoliz ve glukoneogenez dahil olmak üzere glukagon uyarıcı faaliyetler, insülin antagonizmi oluşturur. Glukagon, kortizol ve katekolaminlerle birlikte plazma glukoz seviyeleri yükselir (Ojha, A. ve diğ., 2019). Amilin (37 amino asit peptidi), GLP-1 (30 amino asit peptidi) ve GIP (42 amino asit peptidi) dahil olmak üzere kan şekeri seviyelerini sabit tutmada rol oynayan bir dizi hormon vardır (Kahn, S.E. ve diğ., 2014).

Amilin, insüline benzer şekilde üretilir. Yemekten sonra mide boşalmasını azaltarak glukoz Emilimini artırır. Bağırsaklar, peptitleri veya inkretinleri GLP-1 ve GIP'i üretir. Bu hormonlar, pankreas hücreleri tarafından insülin üretimine ve salınmasına yardımcı olur (Hieronymus, L., ve Griffin, S., 2015). Bu, vücudun glukozu ihtiyaç duyan hücrelerinin ve organlarının onu alamadığı anlamına gelir. Glukozu hücrelere taşıyan enzimlere glukoz taşıyıcıları denir. Glukozu taşıyan iki tip glikoprotein vardır (Stringer, D.M. ve diğ., 2015).

a) Sodyum ve glukozun yardımcı taşıyıcısı (SGLT).

b) Geçiş kolaylaştıran glukoz taşıyıcısı (GLUT).

T2DM'nin patofizyolojisinde rol oynayabilecek bir dizi olası yol Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.4.** T2DM'nin patofizyolojisi (Padhi, S. ve diğ., 2020).

İskelet kası, karaciğer ve yağ dokusu gibi periferik dokular tarafından bozulmuş veya azaltılmış glukoz emilimi, hamilelik sırasında meydana gelen hormonal değişikliklerden kaynaklanır. Plasenta, hücreleri insülinin etkilerine daha az duyarlı hale getiren maddeleri salgılar (McIntyre, H. D. ve diğ., 2019).

## 2.7. Diyabetes Mellitus'un Komplikasyonları

İlgili kan arterinin türüne bağlı olarak, diyabetik sorunlar makro ve mikrovasküler sorunlar olarak ikiye ayrılır. Nöropati, retina dekolmanı ve böbrek yetmezliği mikrovasküler

komplikasyonlara örnek iken; serebral vasküler hastalık ve kardiyovasküler hastalıklar makrovasküler komplikasyonlara örnektir (Fowler, M.J., 2008).

### **2.7.1. Makrovasküler Komplikasyonlar**

Sadece arterler ve venler gibi büyük damarları etkileyen diyabetik problemler makrovasküler komplikasyonlar olarak bilinir. Makrovasküler komplikasyonların en yaygınları arterioskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, serebrovasküler bozukluklar ve periferik arter hastalıklarıdır (Devarapalli, P. ve diğ., 2019).

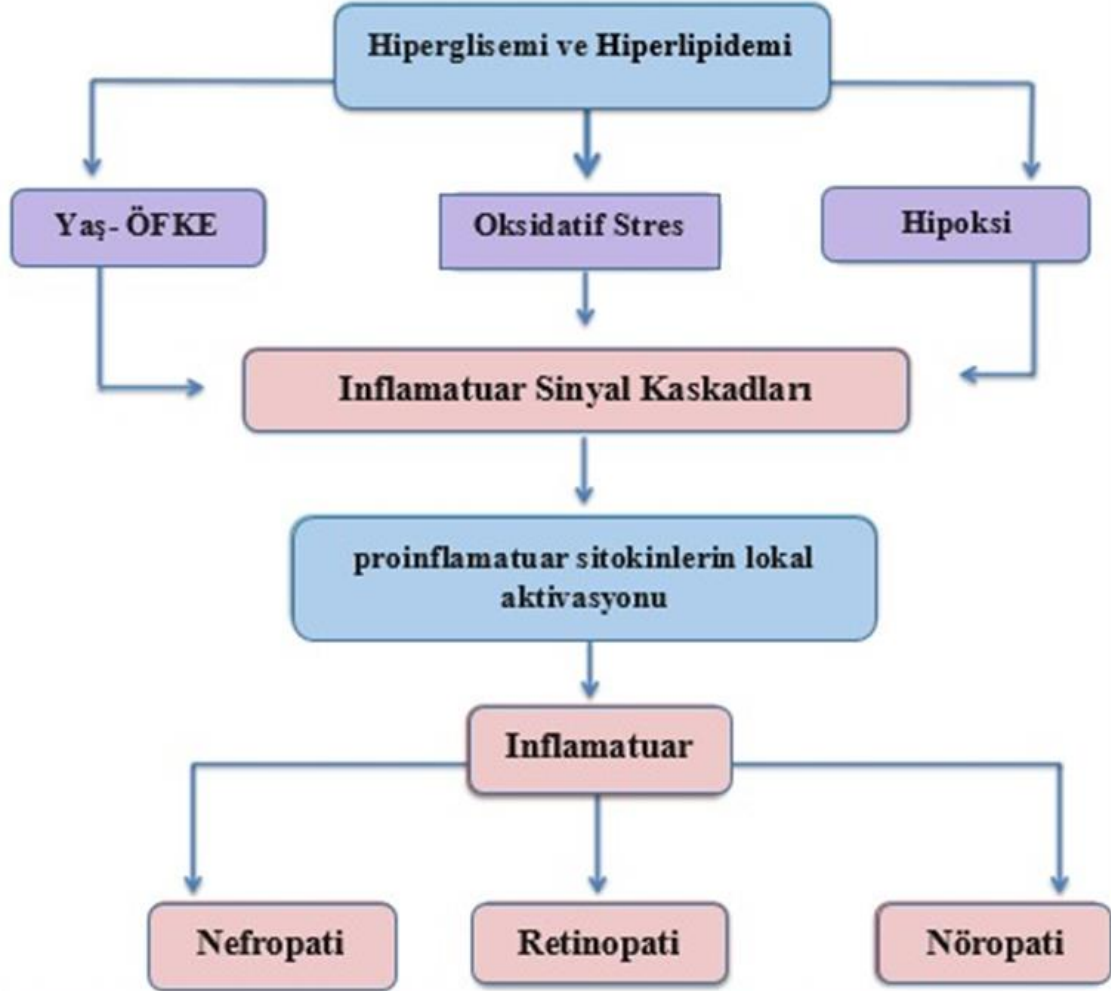
### **2.7.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar**

Kılcal damarlar, şeker hastalığından etkilenen küçük kan arterleridir. Kılcal damarları etkileyen diyabetik problemler mikrovasküler komplikasyonlar olarak bilinir. Diyabetik nefropati, diyabetik nöropati ve diyabetle ilişkili retina hastalığı mikrovasküler komplikasyon örnekleridir (Klemis, V. ve diğ., 2017). Diyabete uzun süreli maruz kalma, çok çeşitli yeni diyabetik sorunların ortaya çıkmasına neden olur. Hem diyabetik nefropatide hem de retinopatide, yüksek kan şekeri seviyeleri temel nedendir (Alam, S. ve diğ., 2021).

Diyabetin neden olduğu yüksek kan şekeri seviyeleri sonucunda diyabetik retinopati, nefropati, nöropati ve diyabetik katarakt gelişir. Kontrolsüz diyabette, korneanın kırılğan damarlarındaki yüksek kan şekeri seviyeleri ozmotik basıncı yükselterek bazı durumlarda kılcal damarların sızmasına veya patlamasına neden olarak korneaya giden kan akışının azalmasına neden olur. Diyabet, glomerüler kılcal damarların tabanını zayıflatarak, protein çapraz bağlarını bozarak ve diyabetik nefropati olarak bilinen bir durum olan idrardaki proteinlerin sızmasını sağlayarak böbreklere zarar verebilir. (Lim, A.K.H., 2014).

Uzun süre devam eden hiperglisemi, kardiyovasküler sistemin kan damarlarına, retinaya, böbreklere ve nöronlara zarar verebilir. Vasküler lezyonlar, diyabetikler arasında en büyük ölüm nedenidir ve kronik diyabetin belirgin bir sonucudur. Vasküler komplikasyonları ve böbrek yetmezliği olan diyabetikler, popülasyonun %22.3-27.2'sini oluşturmaktadır. Yaşamın geri kalanında diyabeti tedavi etmek için vasküler anormalliklerden kaçınmak ve bunları yönetmek çok önemlidir (Wang, C. ve diğ., 2019). İleri yaşlarda olan şeker hastalarının felç ve kalp krizi geçirme olasılığı daha yüksektir. Diyabet ayrıca yaşlılarda demans, depresyon ve enürezis gibi yaşlanma bozuklukları olasılığını artırır (Corriere, M. ve diğ., 2013). Vasküler problemler, T1 ve T2 diyabetli hastalarda morbidite ve ölümün

başlıca nedenidir. Bu vasküler anomalilerin bir sonucu olarak, kalıcı hiperglisemi, oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtlardaki bir artış tarafından indüklenir (Chawla, A. ve diğ., 2016) (Şekil 2.2).



**Şekil 2.5.** Diyabetik mikrovasküler komplikasyonların ilerlemesinde genel yol (Das, A.K. ve diğ., 2019).

### 2.7.3. Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropati (DN), ilk olarak 1936'da Kimmelstiel ve Wilson tarafından interkapiller glomerülonefrit olarak tanımlanan, uzun süreli hipergliseminin neden olduğu bir böbrek hastalığıdır (Lopez-Revuelta, K. ve diğ., 2015). DN'nin başlıca semptomları, idrarda artan protein filtrasyonu (proteinüri), yüksek kan basıncını (hipertansiyon) ve ilerleyici böbrek fonksiyon bozukluğudur. DN ile nadir durumlarda böbrek yetmezliği meydana gelebilir (Kopel, J. ve diğ., 2019).

Zengin ülkelerde, DN son dönem böbrek hastalığının en yaygın nedenidir. Albüminin varlığının uzun zamandır DN'nin tanımlayıcı bir özelliği olduğu düşünülmüştür (Zürbig, P.

ve diğ., 2019), ancak DN'nin patofizyolojisi gizemli olarak kalmıştır. Yapılan araştırmalara göre epigenetik değişiklikler ve belirli mikro RNA'lar, çoklu genlerin ekspresyonunu değiştirerek ve önemli hücre içi yolları düzenleyerek DN'nin gelişiminde rol oynayabilir (Reddy, M. A. ve diğ., 2013). DN önemli bir diyabetik komplikasyondur. Diyabet, böbrek yetmezliğine ve nihai ölüme neden olan en yaygın faktördür (Toth-Manikowski, S., ve Atta, M.G., 2015).

#### **2.7.4. Diyabetik Nöropati**

Diyabetik periferik nöropati, diyabetin sık görülen bir komplikasyonudur. Tanı anında T2DM'li hastaların yaklaşık %10 ila 15'ini ve 10 yıllık hastalık süresinden sonra %50'ye kadarını etkiler (Amerikan Diyabet Derneği, 2019). Diyabetik nöropati, diyabetin en sık görülen kronik komplikasyonudur ve nöropatinin erken tanınması ve uygun tedavinin yapılması önemlidir (Pop-Busui, R. ve diğ., 2017). Diyabetik nöropati diyabetik komplikasyonlar içinde en yaygın olanıdır ve periferik ve otonom sinir sistemlerindeki hasarın ürettiği bir dizi klinik semptomdan oluşur. Toplu olarak çeşitli nöropati türleri olarak bilinen bu semptomlar, yaygın ve lokalize sinir sistemi hasarından kaynaklanır ve tüm diyabet hastalarının yarısına etkiler (Callaghan, B.C. ve diğ., 2015).

#### **2.7.5. Diyabetik Retinopati**

Diyabet, çalışma çağındaki yetişkinler arasında hala önde gelen görme kaybı nedenidir ve diyabetik retinopati (DR) yaygın bir komplikasyondur. Diyabetik retinopati iki aşamalıdır. Hastalığın bir türü proliferatif (PDR) iken, diğeri proliferatif değildir (NPDR). Retinal kan damarlarında geçirgenlikteki artış ve kılcal tıkanıklık, NPDR aşamasının iki ayırt edici özelliğidir. Fundus görüntüleme, hastalığın herhangi bir belirti veya semptomunu sergilemeyen hastalarda mikrovasküler anevrizmalar, kanamalar ve katı eksüdalar gibi retina anormallikleri gösterebilir. PDR aşaması ise daha gelişmiş bir DR şeklidir. Konu diyabetik görme kaybı olduğunda, diyabetik makula ödemi en yaygın hastalıktır. Diyabetik makula ödemi, makula bölgesinde retinanın altında ve içinde sıvı birikmesine denir (Romero-Aroca, P. ve diğ., 2016). Görme kaybına neden olan diyabetik retinopati, T1DM'li hastalarda %80'den fazla prevalansa sahiptir (Anderzén, J. ve diğ., 2016).

Histolojiye göre diyabetle ilişkili retinopatinin ilk belirtisi retinadaki perisitlerin kaybıdır (Arboleda-Velasquez, J.F. ve diğ., 2015). Tip 2 diyabetin mikrovasküler bir sonucu olarak, retina diyabetik retinopatiden zarar görür. Sanayileşmiş dünyada çalışma çağındaki

yetişkinler arasında sık görülen bir diyabet sonucu ve körlüğün önde gelen nedeni diyabetik retinopatidir. retinopati diyabetli herkesi etkileyebilir, ancak Tip 1 diyabetin retinopati riski daha yüksektir (Kashim, R.M. ve diğ., 2018).

## 2.8. Matriks Gla Protein (MGP) ve Tip 2 Diyabetes Mellitus

K vitamini bağımlı protein olan Matriks Gla Protein (MGP), insanlarda doğal olarak oluşan en güçlü kireçlenme inhibitörüdür. MGP, gama-karboksiglutamik asit (Gla) kalıntılarına büyük bir afinite ile bağlanarak hücre dışı kalsiyum seviyelerini kontrol eder. Düşük MGP seviyeleri, kıkırdak dokusunun kalsifikasyonunun artmasına ve kemik mineral yoğunluğunda bir azalmaya neden olur (Tuñón-Le Poultel, D. ve diğ., 2014) Matriks Gla-Protein (MGP), arter duvarının tunika ortamındaki vasküler düz kas hücreleri ve kondrositler tarafından üretilen 14 kDa'luk küçük bir proteindir. MGP proteini hücre tarafından inaktif olarak üretilir ve K vitamini tarafından karboksilasyon (c-MGP) yoluyla aktive edilir. Dolayısıyla, MGP'nin fizyolojik olarak aktif olabilmesi için K vitamini tarafından karboksillenmesi ve fosforile edilmesi gerekir. K vitamini eksikliği durumunda, MGP'nin karboksilatlanmamış, defosforile edilmiş inaktif formu (dp-ucMGP) oluşur (Roumeliotis, S. ve diğ., 2019). MGP'nin aktif hale gelmesi için, defosforile edilmiş-karboksilatlanmamış MGP (dp-ucMGP) iki posttranslasyonel değişikliğe uğrar. dp-ucMGP'nin karboksilasyonu için K vitamini gereklidir.



Aktif MGP, kemik üretimini azaltarak arteriyel kireçlenmeyi önler (Schurgers, L.J. ve diğ., 2013). Tip 2 diyabette, dolaşımdaki dp-ucMGP seviyeleri makrovasküler komplikasyonlarla ilişkilidir (Liabeuf, S. ve diğ., 2014). Ek olarak, kardiyovasküler hastalıklar ve buna bağlı mortalite, dp-ucMGP genine bağlanmıştır (Liu, Y.P. ve diğ., 2015).

## 2.9. K Vitamini ve Tip 2 Diyabetes Mellitus

K vitamini 2-metil-1,4-naftokinon yapısına sahip, yağda çözünen bir vitamindir (Fusaro, M. ve *diğ.*, 2017). K vitamini, proteine bağlı glutamat kalıntılarının gama-karboksi glutamata posttranslasyonel dönüşümünde gama-glutamat karboksilaz için bir kofaktör olarak görev yapar ve kanın pıhtılaşmasında rol oynar (Manna, P., ve Kalita, J., 2016). Phylloquinone (diyetteki birincil K vitamini kaynağı) ve menakinonlar (bakteriler tarafından üretilen K2 vitamini) K vitamininin en yaygın iki formudur (Ferland, G. ve *diğ.*, 2016). K vitamini, insülin duyarlılığını ve glukoz metabolizmasını iyileştirme ve T2DM riskini azaltmadaki yararlı rolü nedeniyle önemli bir mikro besin maddesidir (Rasekhi, H. ve *diğ.*, 2015).

## 2.10. Enflamasyon ve Tip 2 Diyabet

Enflamatuvar reaksiyonlar insülin direncini artırarak T2DM oluşumuna yol açabilir ya da hiperglisemi ile artarak T2DM komplikasyonlarına yol açabilir (Cruz, N.G. ve *diğ.*, 2013). Epidemiyoloji araştırmaları, enflamasyon biyobelirteçleri ile T2DM'nin gelişimi ve uzun vadeli etkileri arasındaki ilişkiyi incelemiştir (Wang, X. ve *diğ.*, 2013). Vasküler düzeyde, inflamasyon diyabetik nefropati, nöropati ve retinopati gibi komplikasyonlarla ilişkili iken, lipotoksisite koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı, inme gibi diyabetin makrovasküler komplikasyonları ile bağlantılıdır (Shah, A. D. ve *diğ.*, 2015).

Enflamasyon, T2DM'nin bir özelliğidir. T2DM metabolik sendromu ve kalp hastalığı olan hastalarda enflamatuvar sitokinler artar. Farklı hücre türleri, enflamatuvar sitokinler üretebilir ve daha sonra bunları kan dolaşımına salabilir (Jafaripour, S. ve *diğ.*, 2020). Kronik inflamasyon onarımdan çok hasara neden olur ve bu da T2DM gelişimine yol açabilir. Yapılan çalışmalar, düşük dereceli inflamasyonun T2DM geliştirme olasılığı ile bağlantılı olduğunu ve subklinik inflamasyonun insülin direncine yol açtığını ve hiperglisemi ve insülin direncinin metabolik sendrom özellikleriyle bağlantılı olduğunu göstermiştir (Victoria, H. ve *diğ.*, 2019).

## 2.11. Fetuin-A ve Tip 2 Diyabetes Mellitus

Fetuin A yalnızca insan hepatositleri tarafından salınan çok işlevli bir glikoproteindir. Fetuin A, hücrelerdeki proteinlerin ve yağların metabolizması da dahil olmak üzere önemli

biyolojik süreçlerle bağlantılıdır. Akut inflamatuvar reaksiyonlar, kemik mineralizasyonu ve kalsifiye matriks metabolizması, nötrofil degranülasyonu, lenfosit alımı, tiroid hormonları ve kalsiyum iyon dengesi, yüksek fetuin düzeylerinden etkilenebilir (Denecke, B. ve diğ., 2003). Futein-A'nın kan dolaşımından kalsiyum ve fosforu uzaklaştırarak vasküler kireçlenmeyi önlemede önemli bir işlevi olduğu belirtilmektedir (Schäfer, C. ve diğ., 2003). Ayrıca Futein -A'nın insülin reseptör substrat-1'i inhibe ederek daha düşük dereceli bir inflamatuvar yanıtı neden olabileceği ve bunun sonucunda insülin direncine yol açacağı belirtilmektedir (Hennige, A.M. ve diğ., 2008).

## **2.12. Tip 2 Diyabetes Mellitus'ta Matriks Metalloproteinazlar (MMP'ler)**

MMP'ler, hem fizyolojik hem de patolojik rollere sahip çinko içeren proteinlerdir. Genetik olarak farklı ancak yapısal olarak benzer olan 34 farklı metalloproteinaz mevcuttur (Vitlianova, K. ve diğ., 2015). Hücreler arası ve bazal membran bileşenlerinin çoğu metalloproteinazlar tarafından yok edilebilir. Yaraların iyileşme sürecinde kolajenazlar (MMP-1 ve MMP-8) ve jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9) önemli bir rol oynar (Yadav, S.S. ve diğ., 2014). Dokuların yeniden şekillenmesi ve hücre dışı matrisin parçalanması, MMP'ler olarak bilinen çinko bağımlı endopeptidazların iki ana işlevidir (Guo, S., ve DiPietro, L.A., 2010). Hiperglisemi, oksidatif stres veya ilerli glikasyon son ürünleri (AGE'ler) doğrudan veya dolaylı olarak MMP aktivitesini artırır (Martins, V.L. ve diğ., 2013). Son yapılan araştırmalarda Tip 2 diyabetiklerde, böbrek fonksiyon bozukluğu ile idrar MMP-9 varlığı arasında bir bağlantı kurulmuştur (García-Tejeda, A.U. ve diğ., 2018).

## **2.13. Tip 2 Diyabetes Mellitus'ta Tümör Nekroz Faktörü-alfa (TNF- $\alpha$ )**

Kronik inflamasyona yanıt olarak üretilen sitokinlerden biri TNF- $\alpha$ , makrofajlar, osteoblastlar, T ve B hücreleri, düz kas hücreleri ve epitel hücrelerinin yanı sıra tümör hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli inflamatuvar hücre tipleri tarafından salgılanır. T2DM'nin pankreastaki kronik, düşük dereceli inflamasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir (Alzamil, H., 2020) İnsülin direnci ve T2DM için, TNF- $\alpha$  süreçteki rolüyle tanınan ilk sitokindir. İskelet ve kalp kaslarında, adipositlerde ve diğer dokularda, TNF- $\alpha$ 'nın, insüline bağımlı bir glukoz taşıyıcısı olan GLUT4 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. İnsülin direnci, insülin substrat-1'in TNF ile indüklenen serin fosforilasyon reseptörünün neden olduğu TNF'yi inhibe eden periferik insülin etkisinden kaynaklanabilir

(Akash, M.S.H. ve diğ., 2018). Kandaki yüksek miktarda TNF- $\alpha$  diyabet ve insülin direncine neden olabilir (Swaroop, J.J. ve diğ., 2012). Tip 2 diyabet ve TNF- $\alpha$  geni, yakın zamanda yapılan bir sistematik inceleme ve meta-analizde ilişkilendirilmiştir (Liu, C. ve diğ., 2016). TNF- $\alpha$ , diğer proinflamatuvar sitokinlerle birlikte, T2DM patogenezinde katkıda bulunan dokuya özgü inflamasyonun etiyolojisinde rol oynar (Akash, M.S.H. ve diğ., 2018).



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Ekipman ve Araçlar

Tez Çalışmasında kullanılan araç ve gereçlerinin tümü Tablo 3.1'de listelenmiştir.

**Tablo 3.1** Çalışmada kullanılan araç ve gereçler.

| No | Araç ve Gereçler                 | Şirket       | Menşe Ülke |
|----|----------------------------------|--------------|------------|
| 1  | Farklı hacimlerde mikropipetler  | Eppendorf    | Almanya    |
| 2  | Çok Kanallı Pipet (50-300µL)     | Biohit       | İngiltere  |
| 3  | Absorbans Mikroplaka Okuyucu     | Karl Kolb    | Almanya    |
| 4  | Kapaklı plastik borular          | Afco-Dispo   | Ürdün      |
| 5  | 96-Kuyulu plaka                  | Bioassay     | Çin        |
| 6  | Santrifüj                        | Kokusan      | Almanya    |
| 7  | Eppendorf Tüpler                 | Sigma        | İngiltere  |
| 8  | Derin Dondurucu (-80 °C)         | Angel Antoni | İtalya     |
| 9  | Jel Tüpler                       | Afco         | Ürdün      |
| 10 | Sıcak plaka karıştırıcı          | LabTech®     | Kore       |
| 11 | İnkübatör                        | Memmert      | Almanya    |
| 12 | Mikrosantrifüj                   | Bioneer      | Kore       |
| 13 | Mikropipet ucu 1000µl            | Axy Gen      | USA        |
| 14 | Mikropipet ucu 200µl             | Axy Gen      | USA        |
| 15 | Mikropipet ucu 10µl              | Axy Gen      | USA        |
| 16 | pH Metre                         | Hanna        | İtalya     |
| 17 | Yüksek hızlı Soğutmalı Santrifüj | Eppendorf    | Almanya    |
| 18 | Hassas Terazı                    | Sartorius    | Almanya    |
| 19 | Spektrofotometre                 | Shimadzu     | Japonya    |
| 20 | Vorteks                          | CYAN         | Belçika    |
| 21 | Buz dolabı                       | Concord      | Lübnan     |

### 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler

Tez Çalışmasında kullanılan kitler Tablo 3.2'de listelenmiştir.

**Tablo 3.2** Çalışmada kullanılan kitler.

| No | Kit                                              | Katalog No | Firma      | Menşe Ülke |
|----|--------------------------------------------------|------------|------------|------------|
| 1  | İnaktif MGP ELISA Kiti                           | E7431Hu    | Biyoanaliz | Çin        |
| 2  | İnsan Tümörü Nekroz Faktörü- $\alpha$ ELISA Kiti | E0082Hu    | Biyoanaliz | Çin        |
| 3  | İnsan MMP-9(matris metalloproteinaz) ELISA Kiti  | E0936Hu    | Biyoanaliz | Çin        |
| 4  | Vitamin K ELISA Kiti                             | E2175Hu    | Biyoanaliz | Çin        |
| 5  | İnsan Feutin ELISA Kiti                          | E1386Hu    | Biyoanaliz | Çin        |
| 6  | Kolesterol Kiti                                  | 37941      | Biyosistem | İspanya    |
| 7  | Üre/Bun Kiti                                     | 35060      | Biyosistem | İspanya    |
| 8  | Trigliserid Kiti                                 | 35204      | Biyosistem | İspanya    |
| 9  | Glukoz Kiti                                      | 34018      | Biyosistem | İspanya    |
| 10 | Kreatin Kiti                                     | 37647      | Biyosistem | İspanya    |

## 3.2. Metod

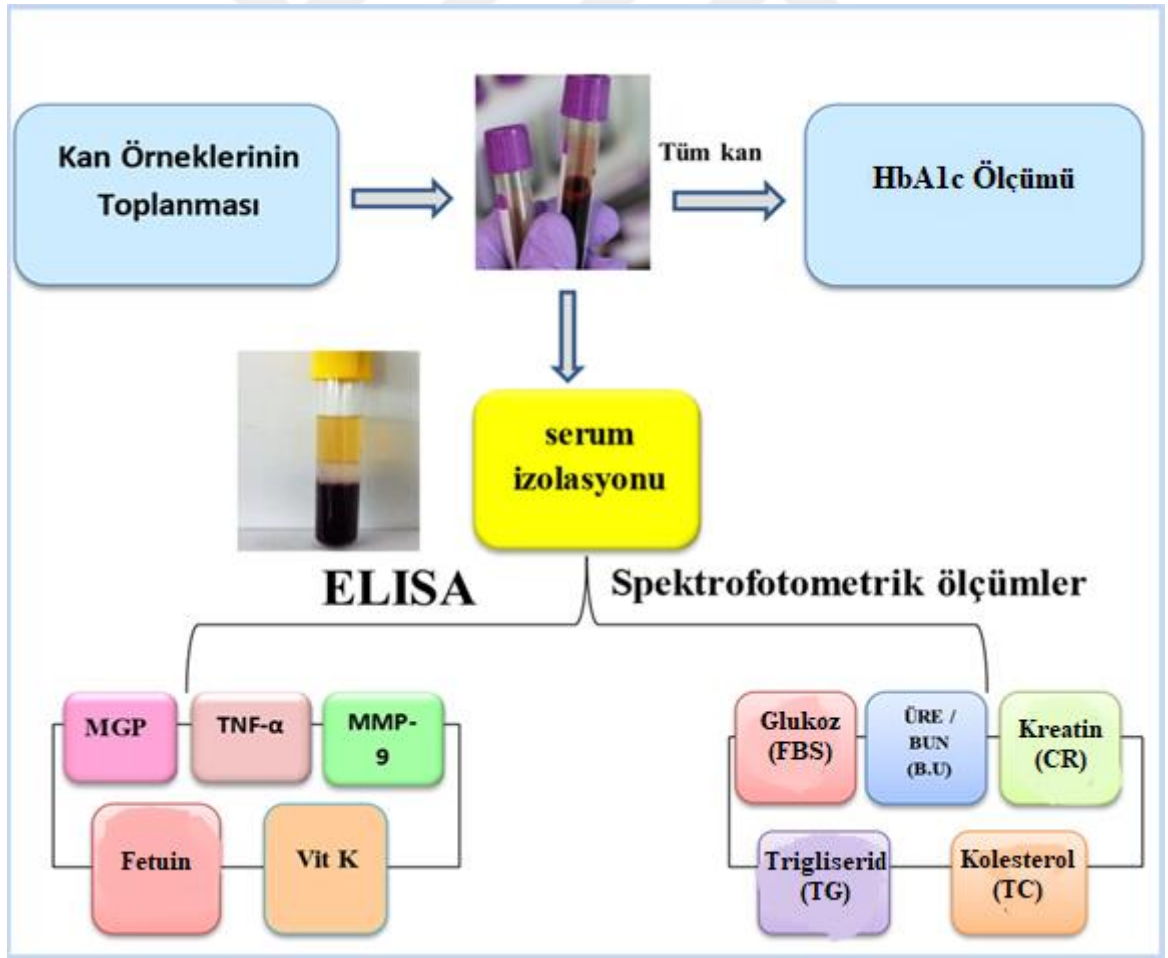
### 3.2.1. Çalışma Tasarımı

Bu çalışmaya hasta grubu olarak; ortalama yaşı  $62,2 \pm 8,1$  olan toplam 160 T2DM hastası katıldı. Bunlar her biri 40 hastadan oluşan dört gruba ayrıldı. Bu gruplar şu şekilde oluşturuldu: **(1. Grup:** Mikrovasküler komplikasyonları olmayan 40 (N=40) T2DM hastası, **2. Grup:** Diyabetik nefropatisi (DN) olan 40 (N=40) T2DM hastası, **3. Grup:** Diyabetik retinopatisi (DR) olan 40 (N=40) T2DM hastası, **4. Grup:** Diyabetik nöropatisi (DNR) olan 40 (N=40) T2DM hastası). Ayrıca 40 sağlıklı denek kontrol grubu olarak alındı. Bu çalışmaya katılan hastalar, Nisan 2021'den Temmuz 2021'e kadar Al-Diwaniyah Eğitim Hastanesi'ne kayıtlı hastalardan oluşmaktaydı. Ayrıca yaş ortalaması ( $58,3 \pm 1,6$ ; 20 erkek, 20 kadın) olan, diyabet öyküsü olmayan ve rutin muayene için hastaneye gelen, görünüşte sağlıklı kırk denek kontrol grubu için alındı. Kontrol grubunun endokrin problemleri, metabolik böbrek problemleri, akut hastalık veya enfeksiyonu yoktu. Tüm laboratuvar testleri Al-Diwaniyah Eğitim Hastanesi ve Al-Qadisiyah Üniversitesi Tıp

Fakültesi Klinik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Vücut kitle indeksi (VKİ), vücut ağırlığının (kg) boyun karesine (metre olarak) bölünmesiyle hesaplandı. Genel veriler: Yaş, cinsiyet ve DM bilgilerinin süresi kaydedildi.

### 3.2.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Tüm gruplardan 5 ml'lik kan örneği bir tüpe alındı. HbA1c analizi için bu kan örneklerinin 1'er mililitresi Dipotassium-EDTA Vacutainer® tüplerine alındı. Kalan kan örneklerinin 4 ml'sinin oda sıcaklığında yarım saat pıhtılaşmasına izin verildi ve 4 °C'de 15-20 dakika 4000 rpm hızında santrifüjlendi. Santrifüjleme sonucunda serum örnekleri elde edildi. Biyokimyasal analiz için serum parçalara ayrıldı ve ependroff tüplerinde (0.3 mL) 20°C'de saklandı. Bu serum örneklerinde açlık kan şekeri (FBS), serum kreatinin (S.Cr), üre (BU), toplam kolesterol (TC), trigliseritler (TG) ve albümin (Alb) ölçümleri spektrofotometrik olarak yapıldı. Ayrıca ELİSA yöntemi ile MGP, TNF- $\alpha$ , MMP-9, fetuin-A, K Vitamini ölçümü yapıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Deneysel tasarım

### 3.2.3. Biyokimyasal Analiz

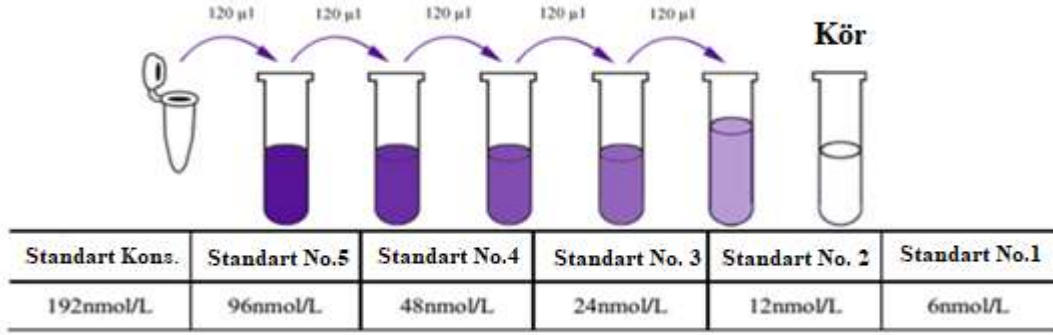
#### 3.2.3.1. ELISA Ölçümleri

dp-ucMGP, TNF-a, MMP-9, K Vitamini ve Fetuin-A'yı ölçmek için sandviç ELISA yöntemi kullanıldı. Standartlar ve numuneler, istenen analiz için uygun bir yakalama antikoru ile önceden kaplanmış 96 oyuklu bir mikro ELISA plakasına yerleştirildi. Bundan sonra, plaka ilk olarak bir numune, ardından biyotinlenmiş bir tespit antikoru ve son olarak bir streptavidin ile inkübe edildi. Plak kuyularına konjuge yaban turpu peroksidaz (HRP) enzimi (HRP enzimi oksitleyici ajan olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e sahiptir) ilave edilerek 37 °C'de inkübe edildi. Tetrametilbenzidin (TMB) substrat olarak daha sonra eklendi ve mavi renk oluşturuldu. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma solüsyonu (sülfürik asit solüsyonu) eklenmesiyle durduruldu. Renkteki değişim bir mikropilaka okuyucu (Karl Kolb, Almanya) kullanılarak 450 nm'de ölçüldü. Konsantrasyon (ng/ml) standart eğriden hesaplandı.

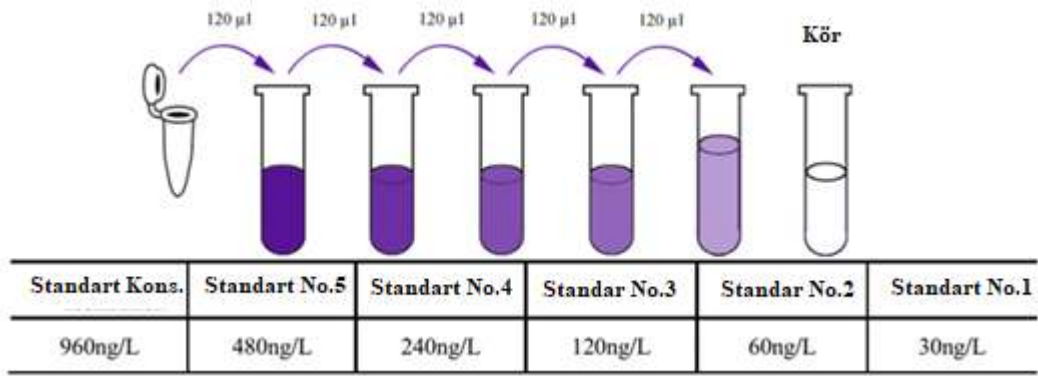
#### 3.2.3.2. Reaktif Hazırlama

Elisa ölçümleri için reaktifler aşağıdaki gibi hazırlandı.

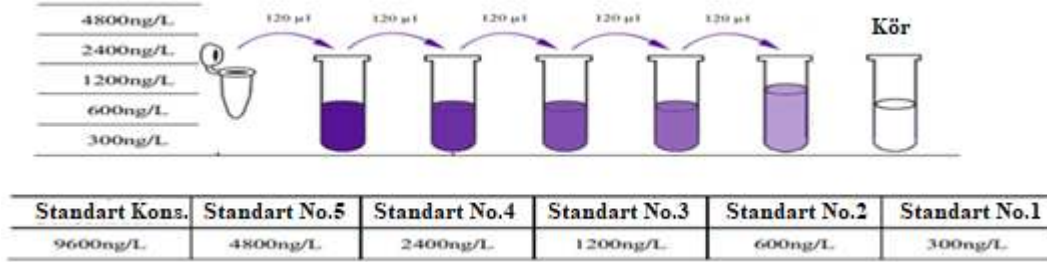
- 1- Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına (18-25 °C) getirildi.
- 2-20 ml konsantre yıkama solüsyonu 1/25 oranında seyreltildi.
- 3- Standart solüsyon kullanımdan 15 dakika önce hazırlandı. 96ng/mL standart stok solüsyonu oluşturmak için 120 µL standart (192 ng/mL), 120µl standart seyreltici ile sulandırıldı ve seyreltmeler yapılmadan önce hafif çalkalama ile 15 dakika beklemesine izin verildi. Ardından standart stok solüsyon standart seyreltici ile seri olarak 1/2 oranında seyreltilerek standart noktaları çoğaltıldı. Standart seyreltici kör olarak kullanıldı (Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6).



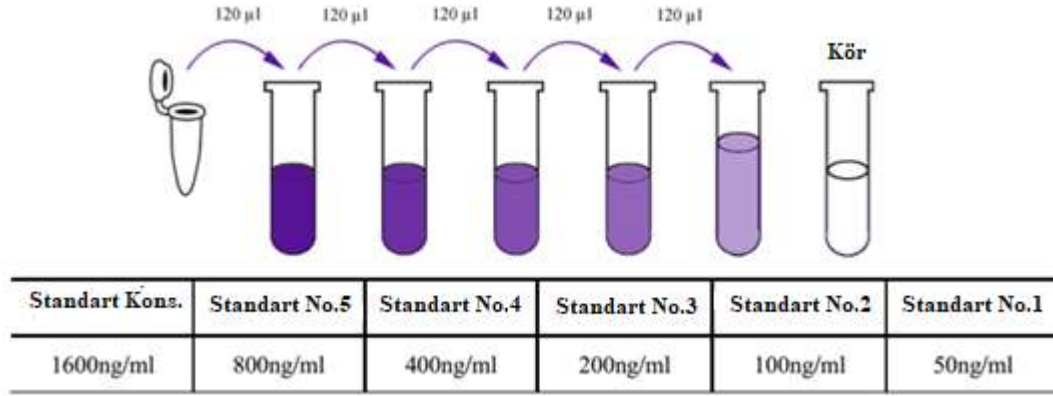
Şekil 3.2. dp-ucMGP ölçümü için standart çözeltinin hazırlanması.



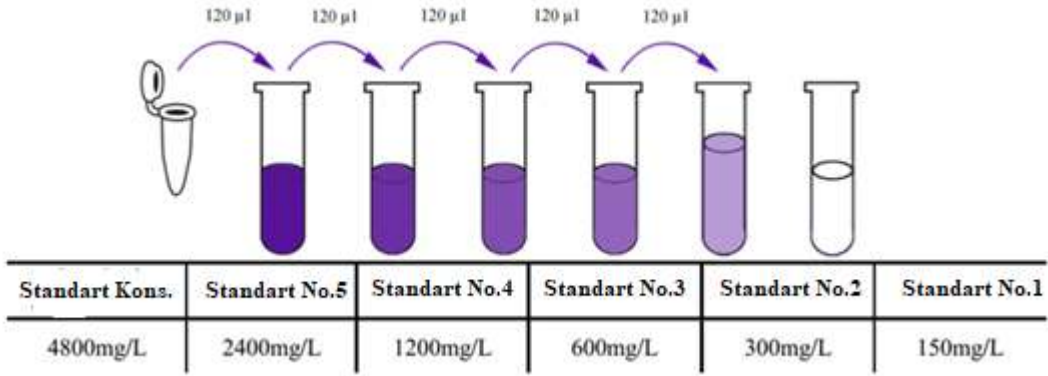
Şekil 3.3. TNF-α ölçümü için standart çözeltinin hazırlanması.



Şekil 3.4. MMP-9 ölçümü için standart çözeltinin hazırlanması.



Şekil 3.5. K Vitamini ölçümü için standart çözeltinin hazırlanması.



Şekil 3.6. Fetuin-A ölçümü için standart çözeltinin hazırlanması.

### 3.2.3.3. ELİSA Prosedürü

1. Testten önce çözünmüş numuneler santrifüjlendi ve tüm kimyasallar bir Vortex mikseri kullanılarak orta derecede vorteksleme ile iyice karıştırıldı.
2. Standart kuyusuna 50 µl standart eklendi.
3. Ölçüm için gerekli olan şeritler çerçevelere yerleştirildi. Kullanılmayan şeritler 2-8 °C'de saklandı.
4. Örnek kuyucuklarına 40 µl olarak eklendi.
5. Örnek kuyularına 10 µl dp-ucMGP, TNF- $\alpha$ , MMP-9, K vitamini ve Fetuin antikoru eklendi (not: antikor standart kuyucuğa eklenmedi çünkü standart çözelti antibiyotik içeriyordu).

6. Örnek kuyucuklara ve standart kuyucuklara 50  $\mu$ L Streptavidin-HRP eklendi. Çözeltiler, ELISA plakasının dibine ilave edildi, hafifçe karıştırıldı ve plaka, bir dolgu macunu ile kaplandı. Daha sonra 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
7. Her kuyu çok kanallı bir pipet kullanılarak yaklaşık 350  $\mu$ l'lik bir yıkama tamponu yüklenerek yıkandı ve ardından aspire edildi, işlem beş kez tekrarlandı.
8. Her bir kuyucuğa 50  $\mu$ l substrat solüsyonu A ve daha sonra her kuyucuğa 50  $\mu$ l substrat solüsyonu B ilave edildi. Karanlıkta 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
9. Her kuyucuğa 50  $\mu$ l durdurma solüsyonu eklendi, bunun sonucunda mavi renk hemen sarıya döndü.
10. Her kuyu için absorbans değeri, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikroparka okuyucu kullanılarak belirlendi



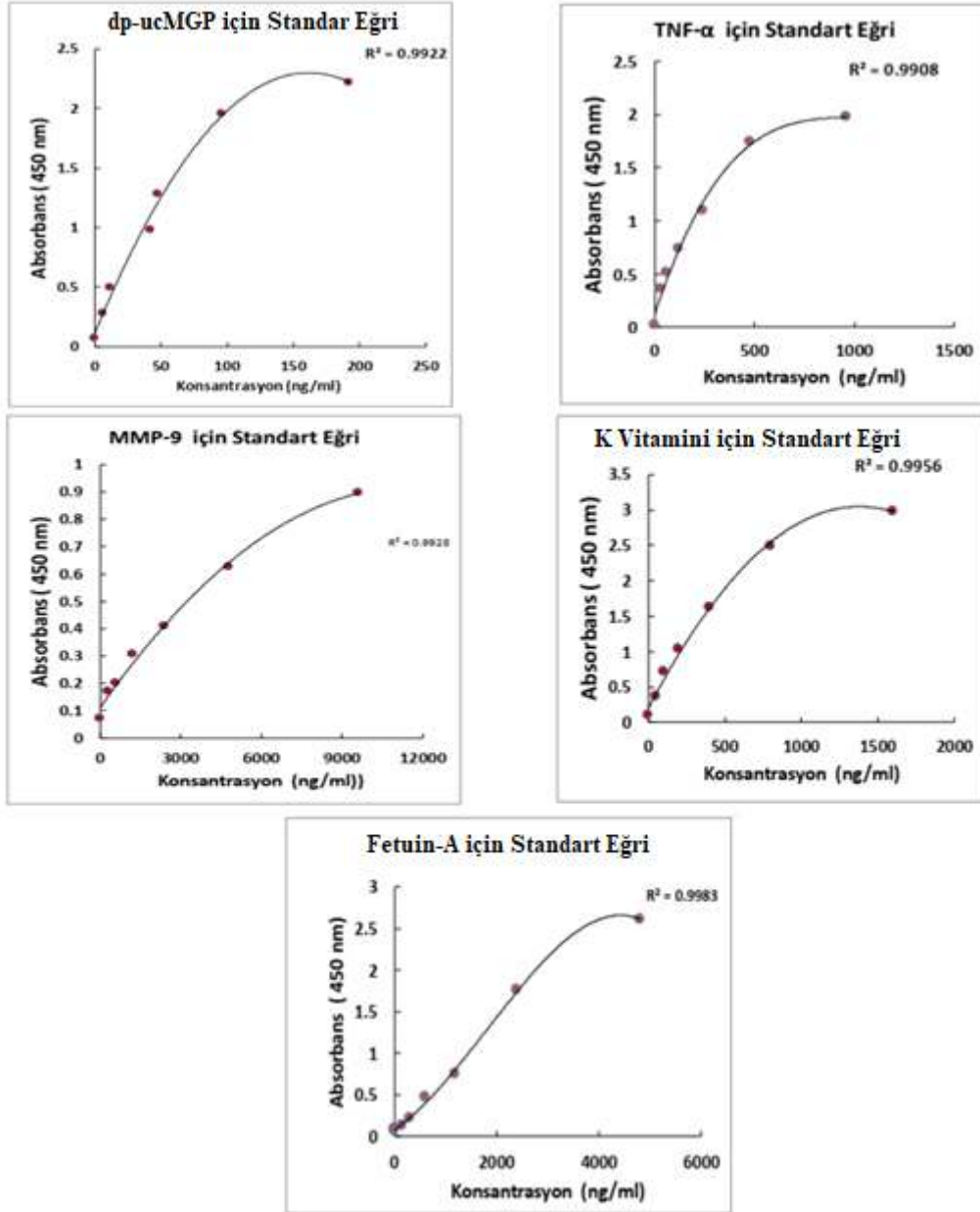
**Şekil 3.7.** ELISA cihazı ve çalışmada kullanılan bazı materyaller



Şekil 3.8. ELISA plakaları

#### 3.2.3.4. *ELİSA Sonuçlarının Hesaplanması*

dp-ucMGP, TNF- $\alpha$ , MMP-9, K Vitamini ve Fetuin konsantrasyonları ng/ml cinsinden aşağıdaki standart eğriler kullanılarak hesaplandı (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9.** dp-ucMGP, TNF- $\alpha$ , MMp-9, K Vitamini ve Fetuin-A'nın ELISA tekniği ile elde edilen standart eğrileri.

### 3.2.3.5. Glukoz Ölçümü

**Prensip:** Numunelerdeki glukoz konsantrasyonu, aşağıda açıklanan reaksiyon prensibi ile belirlendi.

### Glukoz Ölçüm Prosedürü

- 1- Reaktif oda sıcaklığına getirildi.

- 2- Karışım aşağıdaki gibi hazırlandı ve inkübasyon tüplerinde 37 °C'de 5 dakika iyice karıştırıldı.

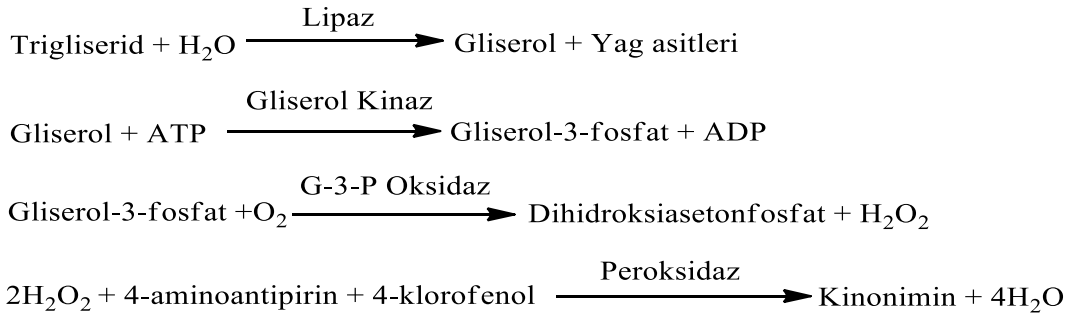
|          | Kör  | Standart | Örnek |
|----------|------|----------|-------|
| Standart | -    | 10 µL    | -     |
| Örnek    | -    | -        | 10 µL |
| Reaktif  | 1 mL | 1 mL     | 1 mL  |

- 3- Standart ve numune için absorbans (A) köre karşı 500 nm'de ölçüldü
- 4- Numunedeki glukoz konsantrasyonu aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\frac{A \text{ örnek}}{A \text{ standart}} \times C \text{ standart } 100 \text{ mg/dl} = C \text{ örnek}$$

### 3.2.3.6. Trigliseritlerin Ölçümü

**Prensip:** Numunelerdeki trigliserid konsantrasyonu, aşağıda açıklanan reaksiyon prensibi ile belirlendi.



### Trigliserid Ölçüm Prosedürü

- 1- Reaktif oda sıcaklığına getirildi.
- 2- Karışım aşağıdaki gibi hazırlandı ve inkübasyon tüplerinde (37 °C) 5 dakika iyice karıştırıldı.

|             | Kör  | Standart | Örnek |
|-------------|------|----------|-------|
| Standart    | -    | 10 µL    | -     |
| Örnek       | -    | -        | 10 µL |
| Reaktif (A) | 1 mL | 1 mL     | 1 mL  |

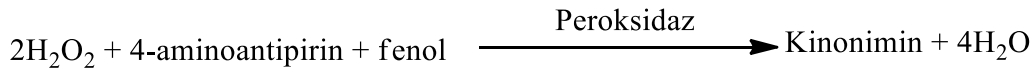
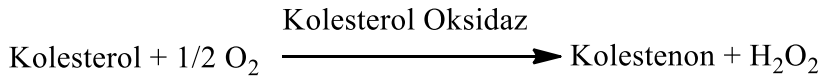
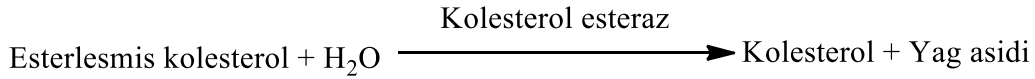
3. Standart ve numune için absorbans (A) köre karşı 500 nm'de ölçüldü.

4. Numunedeki trigliserid konsantrasyonu aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\frac{A_{\text{örnek}}}{A_{\text{standart}}} \times C_{\text{standart 200 mg/dL}} = C_{\text{örnek}}$$

### 3.2.3.7. Kolesterol Ölçümü

**Prensip:** Numunelerdeki kolesterol konsantrasyonu, aşağıda açıklanan reaksiyon prensibi ile belirlendi.



### Kolesterol Ölçüm Prosedürü

1- Reaktif oda sıcaklığına getirildi.

2- Karışım aşağıdaki gibi hazırlandı ve inkübasyon tüplerinde (37 °C) 5 dakika iyice karıştırıldı.

|             | Kör  | Standart | Örnek |
|-------------|------|----------|-------|
| Standart    | -    | 10 µL    | -     |
| Örnek       | -    | -        | 10 µL |
| Reaktif (A) | 1 mL | 1 mL     | 1 mL  |

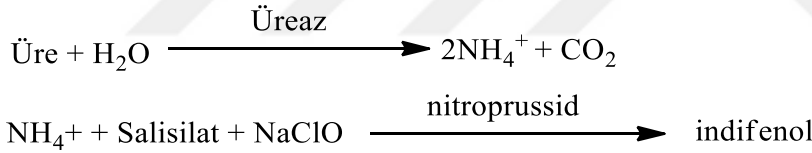
3 - Standart ve numune için absorbands (A) köre karşı 500 nm'de ölçüldü.

4- Numunedeki kolesterol konsantrasyonu aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\frac{A \text{ örnek}}{A \text{ standart}} \times C \text{ standart } 200 \text{ mg/dL} = C \text{ örnek}$$

### 3.2.3.8. Üre/Bun (B.U) Ölçümü

**Prensip:** Numunelerdeki üre konsantrasyonu, aşağıda açıklanan reaksiyon prensibi ile belirlendi.



### Üre Ölçüm Prosedürü

1- Reaktif oda sıcaklığına getirildi.

2- Karışım aşağıdaki gibi hazırlandı ve inkübasyon tüplerinde (37 °C) 5 dakika iyice karıştırıldı.

|             | Kör  | Standart | Örnek |
|-------------|------|----------|-------|
| Standart    | -    | 10 µL    | -     |
| Örnek       | -    | -        | 10 µL |
| Reaktif (A) | 1 mL | 1 mL     | 1 mL  |
| Reaktif (B) | 1 mL | 1 mL     | 1 mL  |

3- Köre karşı 600 nm'de standart ve numunenin absorbandsı (A) okundu.

4- Numunedeki üre konsantrasyonu aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\frac{A \text{ örnek}}{A \text{ standart}} \times C \text{ standart } 50 \text{ mg/dL} = C \text{ örnek}$$

#### 3.2.3.9. Kreatin ölçümü

Prensip: Numunedeki kreatin, alkali ortamda renkli bir kompleks oluşturan pikrat ile reaksiyona girer. Bu reaksiyondan yararlanılarak numulerdeki kreatin ölçüldü.

#### Kreatin Ölçüm Prosedürü

- 1- Kullanmadan önce fonksiyonel dedektörün ve fotometrenin normal sıcaklıkta olduğundan emin olundu.
- 2- Karışım aşağıdaki gibi hazırlandı ve bir küvet alınarak fotometreye koyuldu ve zamanlayıcıyı ayarlandı.

|                  | Kör  | Standart | Örnek |
|------------------|------|----------|-------|
| Standart         | -    | 10 µL    | -     |
| Örnekleme        | -    | -        | 10 µL |
| Çalışma reaktifi | 1 mL | 1 mL     | 1 mL  |

- 3- İlk absorbans (A1) 30 saniye sonra 500 nm'de okunurken, ikinci (A2) 90 saniye sonra okundu.
- 4- Numunedeki kreatin konsantrasyonu aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\frac{(A2-A1) \text{ Örnek}}{(A2-A1) \text{ standart}} \times C_{\text{standart } 2\text{mg/dl}} = C \text{ Örnek}$$

#### 3.2.3.10. HbA1c'nin Kantitatif Tayini

Test, bir sandviç bağışıklık algılama yöntemi kullanılarak yapıldı. Tampondaki antikor, numunedeki antijene bağlanır ve antijen-antikor kompleksi oluşur. Bir test şeridi üzerinde diğer hareketsizleştirilmiş antikor tarafından yakalanmak üzere nitroselüloz matrisi üzerine göç eder. Numunedeki antijen sayısı ne kadar yüksek olursa, antijenik antikorun karmaşıklığı o kadar yüksek olur ve reaktif antikor üzerinde floresan sinyalinin daha güçlü

bir yoğunluđuna yol açar. Kroma testleri için bir alet, kandaki toplam hemogloblin yüzdesi cinsinden glise edilmiş hemogloblin içeriđini gösterir.



şekil 3.10. HbA1c'yi ölçmek için kullanılan Chroma HbA1c cihazı.

### 3.3. İstatistiksel Analiz

SEM ortalamaları ve standart hatası, verileri tanımlamak için kullanıldı. Andersen-Darling testini kullanarak verilerin normal olup olmadığı belirlendi. Kontrol ve hasta grupları arasındaki anlamlı farklılıkları araştırmak için uygun bir tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey testi kullanılarak bir post hoc analizi kullanıldı. Tüm durumlarda, 0,05'ten küçük bir P değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Genel Özellikleri

Bu çalışmaya hasta grubu olarak; ortalama yaşı  $62,2 \pm 8,1$  olan toplam 160 T2DM hastası katıldı. DM grubu, yüzde 67,5 kadın ve yüzde 32,5 erkek olmak üzere, yaş ortalaması  $56 \pm 1,3$  olan, mikrovasküler sorunu olmayan 40 T2DM'li bireyi içeriyordu. Cinsiyet ayrımı yüzde 62,5 kadın ve yüzde 37,5 erkek olmak üzere toplam 40 hastada DN vardı ve ortalama yaş  $61,2 \pm 8,0$  idi. Ortalama yaşı  $58,3 \pm 1,6$  olan ve cinsiyet dağılımı %42,5'i kadından %57,5'i erkek olan 40 DR'li birey vardı. DNR'si olan 40 hastanın yaş ortalaması  $57 \pm 1,7$  olup, bunların yüzde 52,5'i kadın, yüzde 47,5'i erkekti. Kontrol grubu olarak, yaş ortalaması  $52,9 \pm 1,2$  olan, %50 kadın ve %50 erkek olmak üzere toplam kırk sağlıklı kişi alındı (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Hasta ve kontrol gruplarının genel özellikleri.

| Grup                                                                         | T2DM         | DN             | DR             | DNR          | Kontrol        |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------|----------------|--------------|----------------|
| Özellikler                                                                   |              |                |                |              |                |
| Toplam Sayı                                                                  | 40           | 40             | 40             | 40           | 40             |
| Kadın, n(%)                                                                  | 27(67,5%)    | 25(62,5%)      | 17(42,5%)      | 21(52,5%)    | 20(50%)        |
| Erkek, n(%)                                                                  | 13(32,5%)    | 15(37,5%)      | 23(57,5%)      | 19(47,5%)    | 20(50%)        |
| Yaş (y)<br>Ortalama $\pm$ S.D                                                | $56 \pm 1,3$ | $61,2 \pm 8,0$ | $58,3 \pm 1,6$ | $57 \pm 1,7$ | $52,9 \pm 1,2$ |
| Ailede hastalık<br>öyküsü<br>Evet                                            | 19           | 30             | 12             | 24           | 0              |
| Ailede hastalık<br>öyküsü<br>Hayır                                           | 21           | 10             | 28             | 16           | 40             |
| * DN: Diyabetik nefropati, DR: Diyabetik Retinopati, DNR: Diyabetik Nöropati |              |                |                |              |                |

#### 4.2. Biyokimyasal Değerlendirme

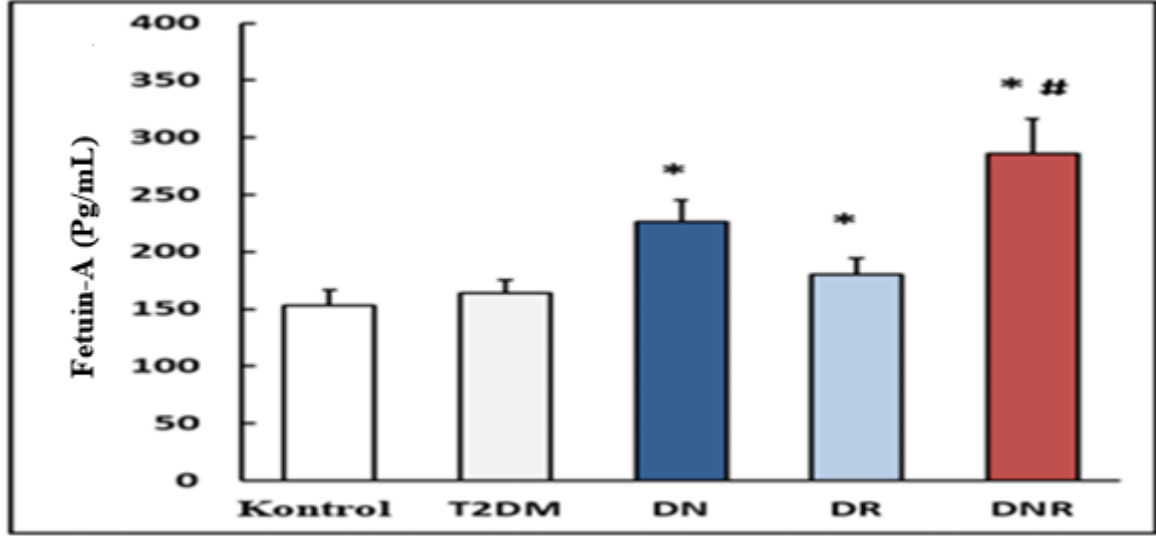
T2DM, DN, DR ve DNR grupları, Tablo 4.2'de belirtildiği gibi klinik ve biyokimyasal özellikler kullanılarak bir kontrol grubuyla karşılaştırıldı. T2DM, DN, DR ve DNR gruplarının FBS seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde yüksekti ( $P \leq 0,05$ ). T2DM, DN, DR, DNR gruplarında kontrol grubuna kıyasla albümin konsantrasyonu ( $P \leq 0,05$ ) azalırken, S.Cr ve BU konsantrasyonlarında önemli bir artış meydana geldi. Ayrıca, kontrol grubuna kıyasla DN, DR ve DNR grupları arasında TG ve TC konsantrasyonlarında anlamlı bir fark vardı ( $P \leq 0,05$ ).

**Tablo 4.2.** Çalışma gruplarında klinik, biyokimyasal ve hemodinamik değişkenlerin karşılaştırılması.

| Parametreler                                                                                                                                                                                                                                                 | T2DM        | DN          | DR          | DNR         | Kontrol    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| FBS(mg/dL)                                                                                                                                                                                                                                                   | 284,8±17,8* | 301,2±19,4* | 355,2±56,1* | 331,7±15,9* | 97,3±2,0   |
| HbA1c (%)                                                                                                                                                                                                                                                    | 7,87±0,2*   | 8,8±0,2*    | 8,9±1,4*    | 8,6±0,2*    | 5,1±0,2    |
| BU (mg/dL)                                                                                                                                                                                                                                                   | 31,8±1,2    | 116±8,6*    | 34,1±5,3    | 35,7±1,5    | 27,9±0,9   |
| S.Cr (mg/dL)                                                                                                                                                                                                                                                 | 0,7±0,3     | 3,5±0,2*    | 0,7±1,2     | 0,8±0       | 0,6±0,2    |
| Alb (mg/dL)                                                                                                                                                                                                                                                  | 3,6±0,4     | 3,2±0,8     | 3,6±0,5     | 3,5±0       | 3,7±0,2    |
| TG (mg/dL)                                                                                                                                                                                                                                                   | 215±13,3    | 256,8±12,4* | 268,6±42*   | 274 ±14*    | 103,3 ±3,7 |
| TC (mg/dL)                                                                                                                                                                                                                                                   | 193,1 ±5,9  | 207 ±5,9*   | 203 ±32*    | 209 ±4,5*   | 166,3±3,2  |
| *FBS: Açlık kan şekeri, Cr: Kreatinin, BU: Kan üre, Alb: Albümin, TG: trigliseritler, TC: toplam kolesterol, * kontrole kıyasla önemli farklılıkları gösterir ( $P \leq 0,05$ ). DN: Diyabetik nefropati, DR: Diyabetik Retinopati, DNR: Diyabetik Nöropati. |             |             |             |             |            |

#### 4.3. Serum Fetuin-A Seviyeleri

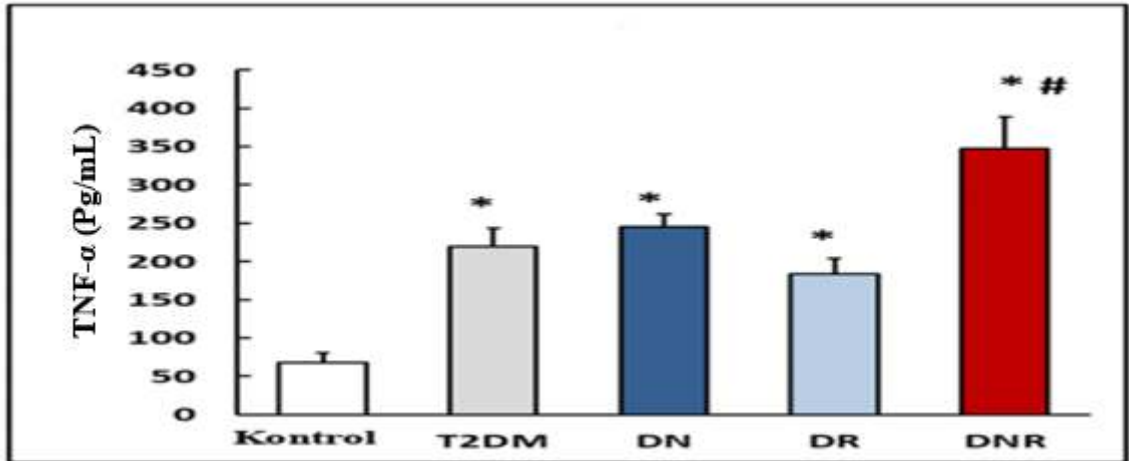
Serum Fetuin-A konsantrasyonları ELİSA ile ölçüldü. Bu çalışmada, serum Fetuin-A seviyelerinin, kontrol grubuna kıyasla T2DM, DN, DR ve DNR gruplarında önemli bir artışa sahip olduğu görüldü ( $P \leq 0,05$ ) (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** T2DM, DN, DR, DNR hastaları ve kontrol gruplarında Serum Fetuin-A seviyeleri. \* Veriler, ortalama  $\pm$  SEM olarak ifade edilir, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli farklılıkları belirtir ( $P < 0,05$ ). T2DM: Tip 2 diabetes mellitus, DN: Diyabetik nefropati, DR: Diyabetik Retinopati, DNR Diyabetik Nöropati.

#### 4.4. Serum TNF- $\alpha$ Seviyeleri

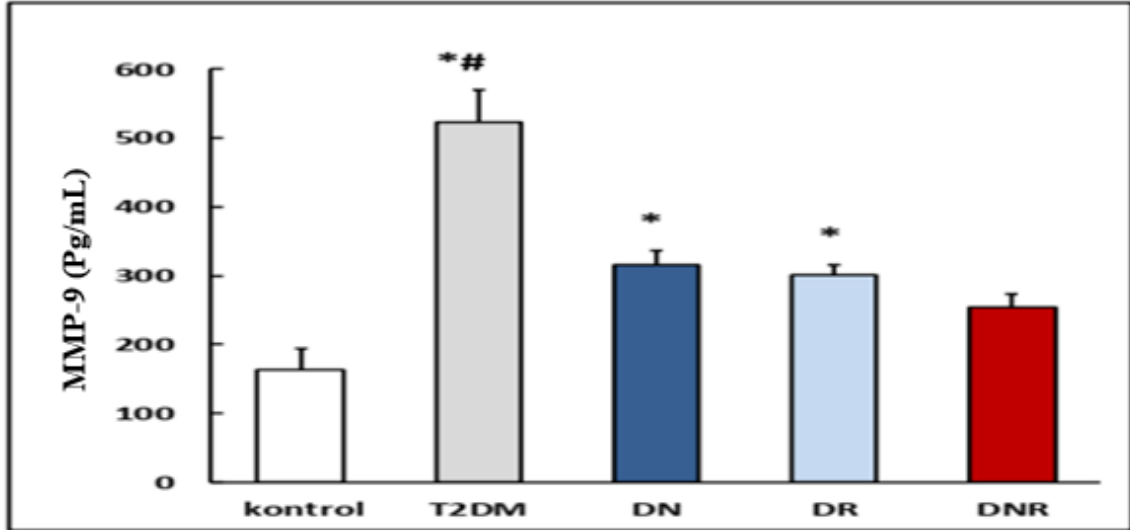
Serumdaki TNF- $\alpha$  seviyeleri ELİSA yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu çalışmada, serum TNF- $\alpha$  seviyelerinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında T2DM, DN, DR ve DNR gruplarında önemli bir farkla arttığı görüldü ( $P \leq 0,05$ ), Şekil 4.2. Ayrıca, DNR grubundaki hastaların diğer gruplardakilerden önemli ölçüde farklı olduğu bulundu ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.2.** T2DM, DN, DR, DNR ve kontrol grubundaki hastalarda serum TNF- $\alpha$  seviyeleri. \* Veriler, ortalama  $\pm$  SEM olarak ifade edilir, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli farklılıkları belirtir ( $P < 0,05$ ). T2DM: Tip 2 diabetes mellitus, DN: Diyabetik nefropati, DR: Diyabetik Retinopati, DNR: Diyabetik Nöropati.

#### 4.5. Serum MMP-9 Seviyeleri

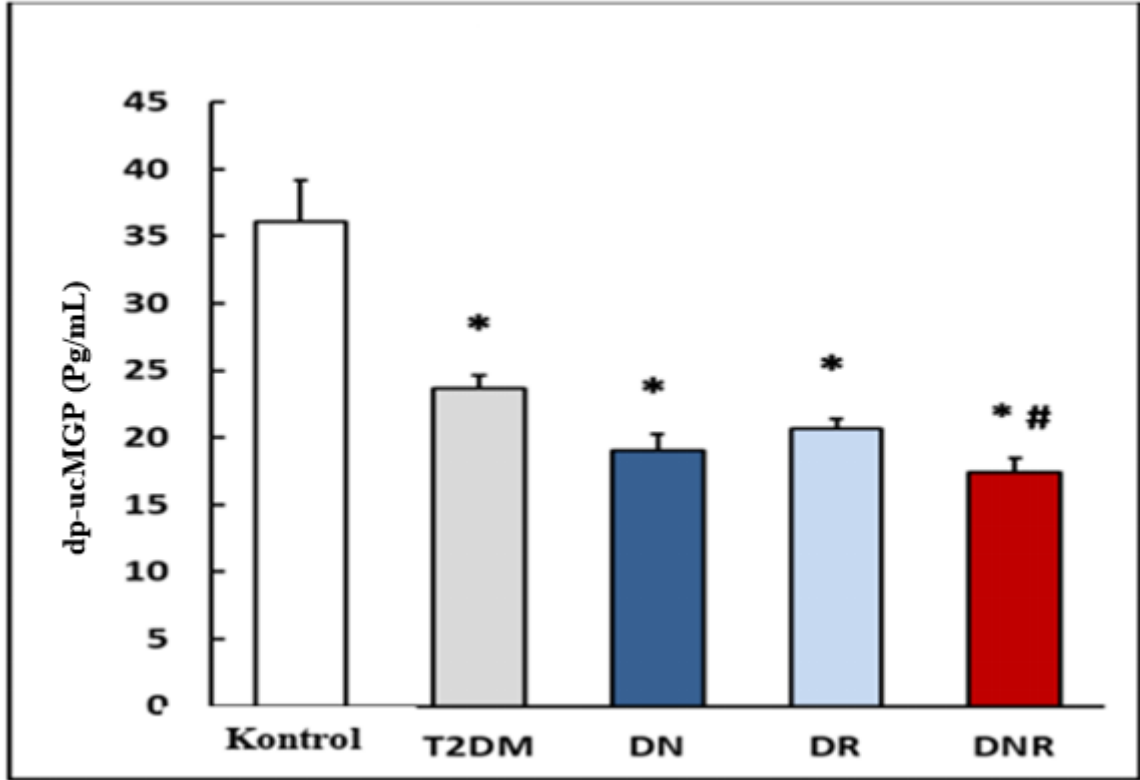
Bu çalışmada T2DM, DN, DR ve DNR hastalarının kanlarında sağlıklı bireylere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek MMP-9 seviyeleri olduğu görüldü ( $P \leq 0,05$ ) (Şekil 4.3). T2DM grubunun sonuçları diğer grupların sonuçlarından önemli ölçüde farklıydı.



**Şekil 4.3.** T2DM, DN, DR, DNR ve kontrol grubundaki hastalarda serum MMP-9 seviyeleri. \* Veriler, ortalama  $\pm$  SEM olarak ifade edilir, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli farklılıkları belirtir ( $P < 0,05$ ). T2DM: Tip 2 diabetes mellitus, DN: Diyabetik nefropati, DR: Diyabetik Retinopati, DNR: Diyabetik Nöropati.

#### 4.6. Serum dp-ucMGP Seviyesi

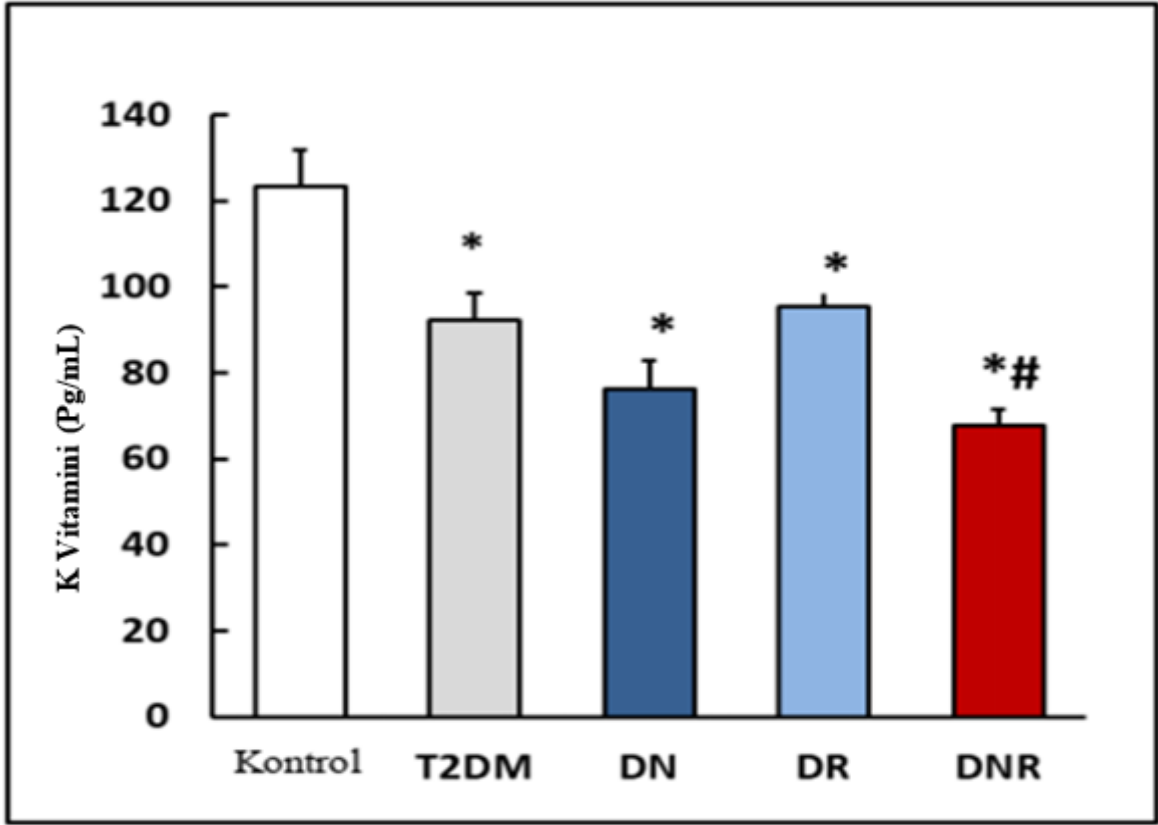
dp-ucMGP'nin serum seviyelerini belirlemek için ELİSA yöntemi kullanıldı. Mevcut bulgulara göre, T2DM, DN, DR ve DNR'li hastaların kan dp-ucMGP seviyeleri kontrol gruplarındakilere göre önemli ölçüde daha düşüktü ( $P \leq 0,05$ ), (Şekil 4.4). DNR grubunda diğer hasta gruplarına kıyasla önemli bir azalma vardı ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.4.** T2DM, DN, DR, DNR ve kontrol grubundaki hastalarda serum dp-ucMGP seviyeleri. \* Veriler, ortalama  $\pm$  SEM olarak ifade edilir, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli farklılıkları belirtir ( $P < 0,05$ ). T2DM: Tip 2 diabetes mellitus, DN: Diyabetik nefropati, DR: Diyabetik Retinopati, DNR: Diyabetik Nöropati

#### 4.7. Serum K Vitamini Seviyeleri

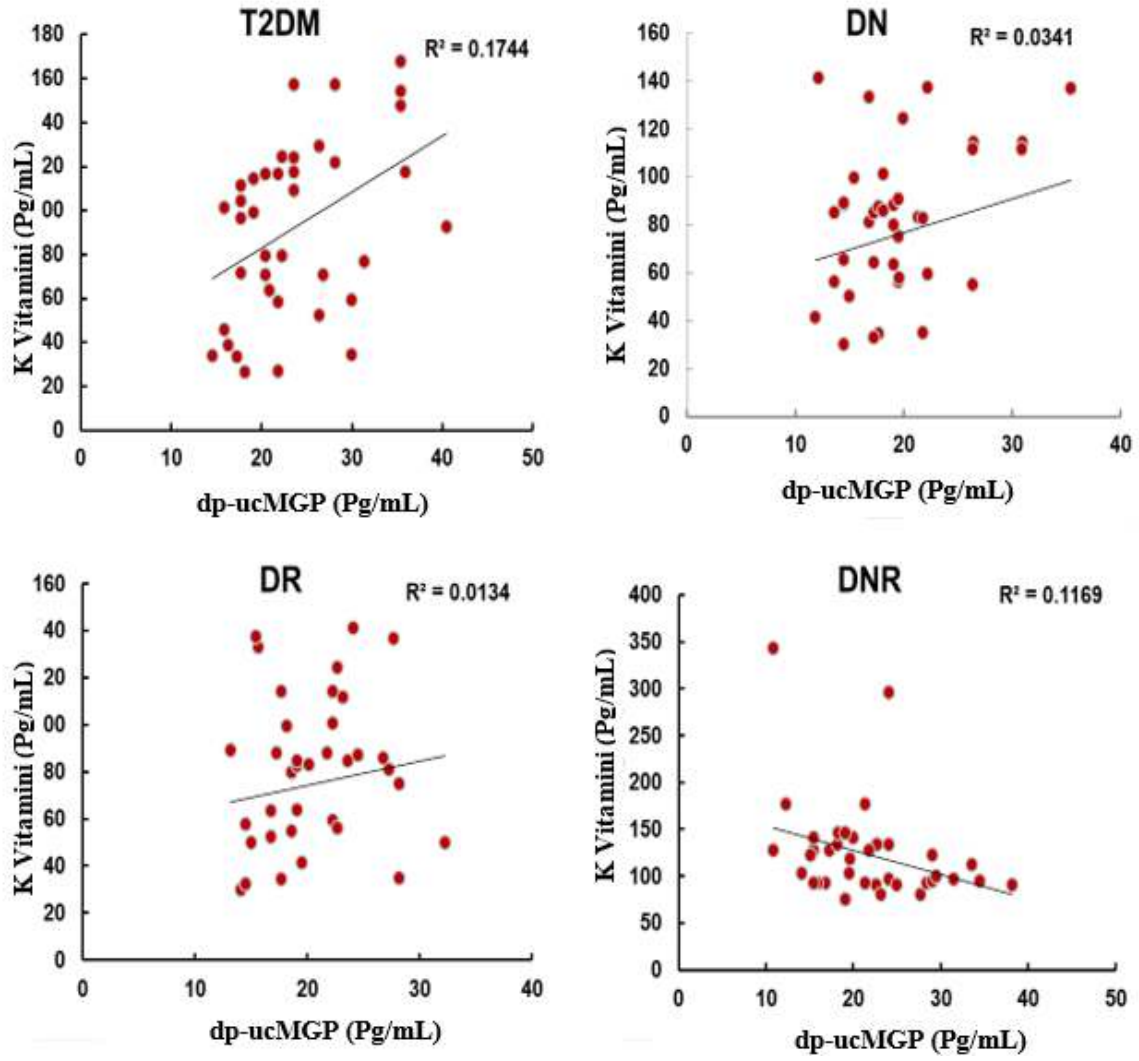
Serum K vitamini seviyelerini ölçmek için ELİSA yöntemi kullanıldı. Bu çalışmada DR, DNR ve T2DM hastalarının, kontrol gruplarına göre önemli ölçüde daha düşük K vitamini seviyelerine sahip olduğu görüldü ( $P < 0,05$ ), (Şekil 4.5). Sonuçlar ayrıca DNR grubu ve diğer hasta grupları arasında önemli bir düşüş gösterdi ( $P < 0,05$ ). dp-ucMGP ve K vitamininin DNR'de güçlü bir negatif bağlantısı vardı.



**Şekil 4.5.** T2DM, DN, DR, DNR ve kontrol grubundaki hastalarda serum K vitamin seviyeleri. \* Veriler, ortalama  $\pm$  SEM olarak ifade edilir, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli farklılıkları belirtir ( $P < 0,05$ ). T2DM: Tip 2 diabetes mellitus, DN: Diyabetik nefropati, DR: Diyabetik Retinopati, DNR: Diyabetik Nöropati.

#### 4.8. K Vitamini ve dp-ucMGP Arasındaki Korelasyon

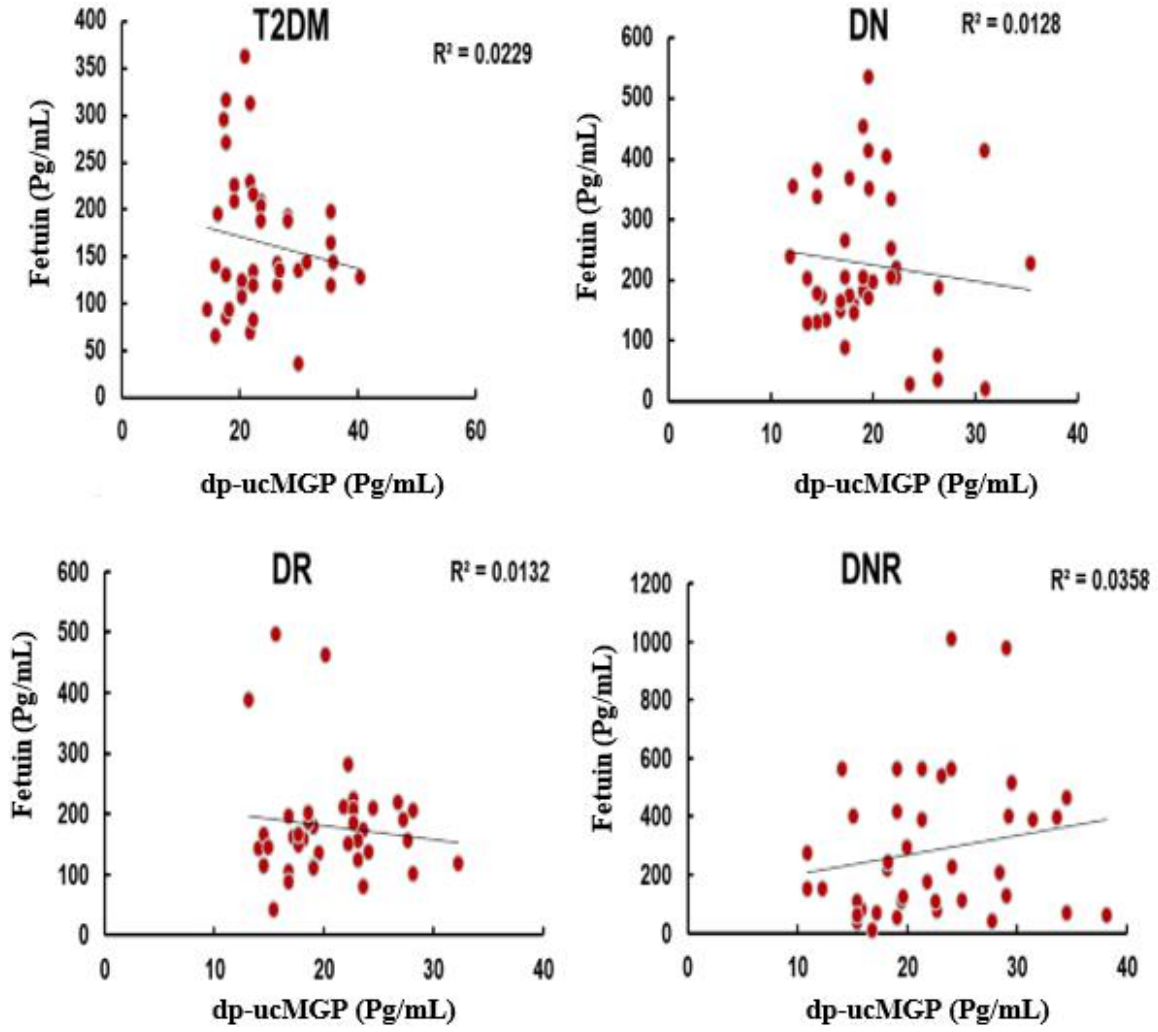
dp-ucMGP seviyeleri, T2DM, DN ve DR'de K-Vitamini ile önemli pozitif korelasyon göstermedi (Tablo 4.3). Ayrıca dp-ucMGP ve K vitamininin DNR'de önemli bir negatif korelasyona sahip olduğu gözlemlendi ( $r=-0.341$ ,  $P<0,05$ ), (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Hasta gruplarında K vitamini ve dp-ucMGP arasındaki korelasyon.

#### 4.9. dp-ucMGP ve Fetuin-A Arasındaki Korelasyon

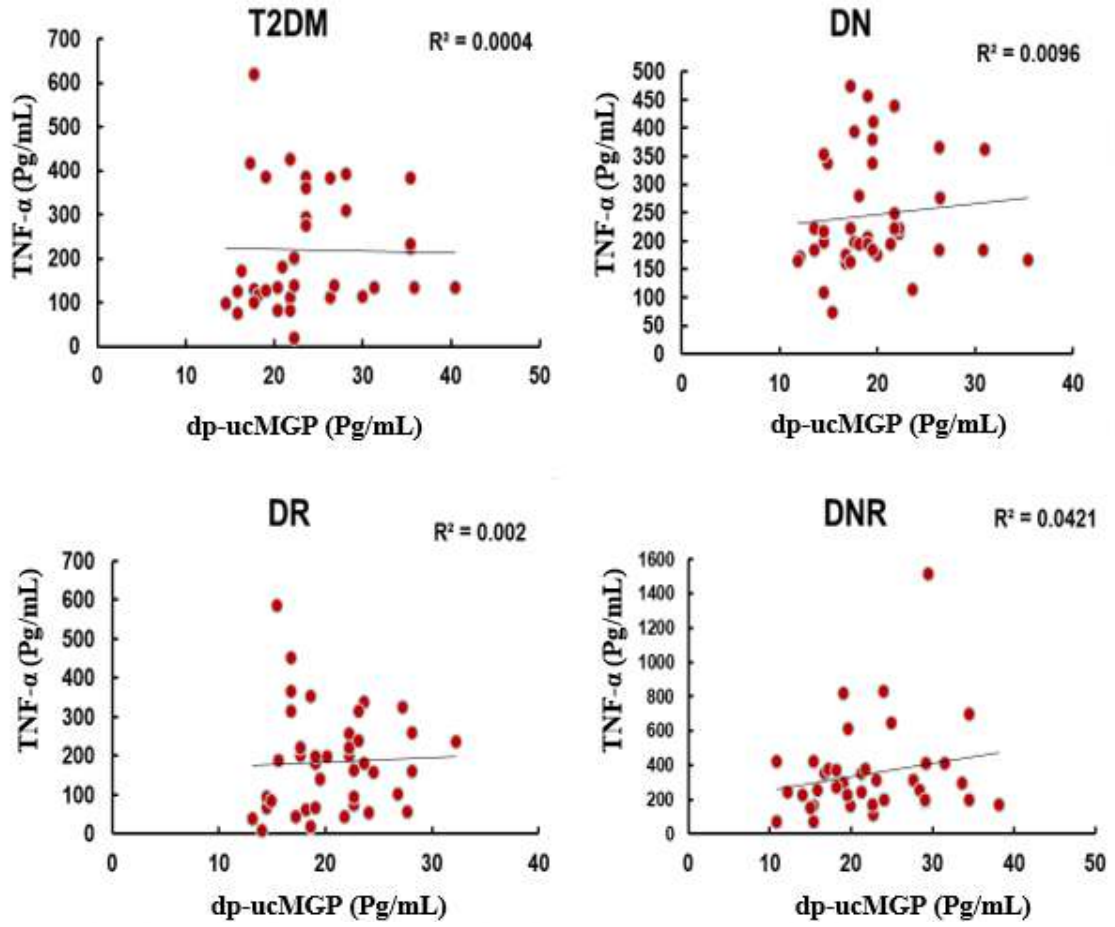
T2DM, DN ve DR'de fetuin-A seviyeleri ile dp-ucMGP seviyeleri arasında negatif korelasyon ( $r = -0,15, -0,113, -0,114, P > 0,05$ ) (Tablo 4.3), DNR'de ise pozitif korelasyon bulundu ( $r = 0,18, P > 0,05$ ) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Hasta gruplarında fetuin-A ve dp-ucMGP arasındaki korelasyon

#### 4.10. dp-ucMGP ve TNF- $\alpha$ Arasındaki Korelasyon

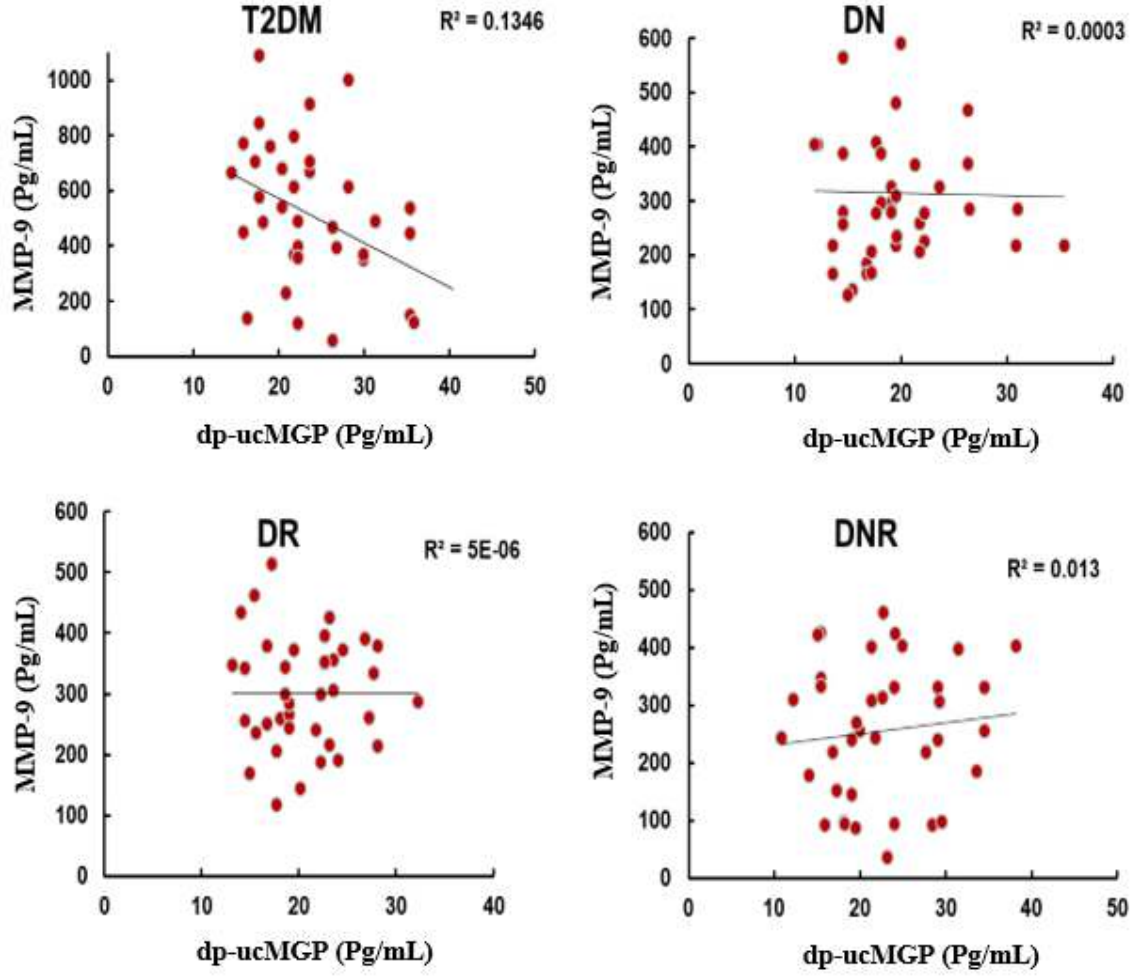
T2DM grubunda dp-ucMGP seviyeleri ve TNF-a seviyeleri arasındaki korelasyon önemsiz düzeydeydi ( $r = -0,005$ ,  $P > 0,05$ ), ancak diğer hasta gruplarında (DN, DR ve DNR) dp-ucMGP seviyeleri ve TNF-a seviyeleri arasındaki korelasyon pozitif (Sırasıyla,  $r = 0,065$ ,  $0,03$  ve  $0,27$ ) ( $P > 0,05$ ), (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** Hasta gruplarında TNF- $\alpha$  ve dp-ucMGP arasındaki korelasyon

#### 4.11. dp-ucMGP ve MMP-9 Arasındaki Korelasyon

T2DM, DN ve DR'de MMP-9 ile dp-ucMGP seviyeleri arasında negatif bir korelasyon gözlemlendi (sırasıyla  $r = -0,36$ ,  $-0,047$  ve  $-0,004$ ). T2DM'de oldukça önemli bir değere sahip bir korelasyon belirtildi ( $P < 0,01$ ), (Tablo 4.3). DNR'de dp-ucMGP ile MMP-9 arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlendi ( $r=0,7$ ,  $P<0,01$ ), (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Hasta gruplarında MMP-9 ve dp-ucMGP arasındaki korelasyon.

Tablo 4.3. Hasta gruplarında dp-ucMGP ile diğer biyobelirteçler arasındaki korelasyon.

| Parametreler  | dp-ucMGP |          |          |          |          |          |          |          |
|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|               | T2DM     |          | DN       |          | DR       |          | DNR      |          |
|               | r-değeri | p-değeri | r-değeri | p-değeri | r-değeri | p-değeri | r-değeri | p-değeri |
| K Vitamini    | 0,41     | 0,55     | 0,18     | 0,87     | 0,12     | 0,76     | -0,34*   | 0,01     |
| Fetuin-A      | -0,15    | 0,17     | -0,11    | 0,24     | -0,11    | 0,23     | 0,18     | 0,87     |
| TNF- $\alpha$ | -0,005   | 0,48     | 0,065    | 0,65     | 0,03     | 0,57     | 0,27     | 0,9      |
| MMP-9         | -0,36*   | 0,01     | -0,047   | 0,38     | -0,004   | 0,48     | 0,7*     | 0,01     |

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

### 5.1. Biyokimyasal Değerlendirme

Bu çalışmada T2DM, DN, DR ve DNR'nin klinik, biyokimyasal ve hemodinamik değişkenleri Tablo 4.2'de gösterildiği gibi kontrol ile karşılaştırıldı. T2DM, DN, DR ve DNR gruplarının açlık kan şekeri ve HbA1c seviyeleri kontrole kıyasla önemli ölçüde arttı ( $P < 0,05$ ). Diğer gruplara göre DN'de serum kreatinin ve üre değerinde anlamlı bir artış bulunurken, albümin konsantrasyonu azaldı ( $P \leq 0,05$ ).

Hiperglisemisi, büyük ölçüde, tip 2 diyabetin patogenezinde rol oynayan ana faktör olan  $\beta$ -hücrelerinin insülin salgılama işlevinin bozulmasından kaynaklanır (Gerich, J.E., 1998). ve oksijen eksikliğinin bir sonucu olarak yüksek tansiyon ve kan damarı hasarı meydana gelebilir (Fowler, M.J., 2008). Bu durum vücut dokularına zarar verebilir ve T2DM hastalarının gözleri, böbrekleri ve sinirlerinde gelişen komplikasyonlara neden olabilir. Uzun vadeli glisemik yönetimin temel bir ölçüsü olan HbA1c, bir kişinin önceki iki ila üç aydaki genel glisemik profilini gösterir ve değerli bilgiler sağlar (Sherwani, S.I. ve diğ., 2016). Artan HbA1c değişkenliği, T2DM komplikasyonları ile yakından ilişkilidir ve güçlü bir gösterge olarak kabul edilebilir. Bu çalışmada da T2DM, DN, DR ve DNR gruplarında HbA1c seviyesi kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artış göstermiştir.

TG seviyesi diyabet için bağımsız bir risk faktörüdür ve diyabet tahmininin bir göstergesi olabilir. Kandaki yüksek seviyelerdeki lipidler (kolesterol ve trigliseritler) kan damarlarına ve arterlere zarar verir ve kalp hastalığı ve diğer rahatsızlıkların riskini artırır (Rafieian-Kopaei, M. ve diğ., 2014). T2DM'deki yüksek TG ve TC seviyelerini açıklayan potansiyel mekanizma, serbest yağ metabolik yollarına atıfta bulunabilir, çünkü büyük miktarda FFA, TNF- $\alpha$  ve yağ dokusu tarafından salınan diğer bileşikler insülin direnci üretebilir. Ayrıca plazma FFA, hücrelere kolayca girebilir ve yeniden esterleşebilir ve TG olarak veya TC sentezi için depolanabilir, bu da TG ve TC seviyelerini yükseltir ve TG birikmesine neden olabilir (Boden, G., 2008). Çalışmamızda, kontrol grubuna kıyasla DN, DR ve DNR grupları arasında TG ve TC konsantrasyonlarında anlamlı bir fark ( $P \leq 0,05$ ) olduğu tespit edilmiştir ve bu sonuçlar literatürle uyumludur.

## 5.2. Serum Fetuin-A Düzeyleri

Fetuin-A, karaciğer ve iskelet kasında insülin direncine neden olur (Yılmaz, A. ve diğ., 2018). Yapılan bir çalışmada, T2DM ve periferik arter hastalığı (PAH) olan hastalarda, T2DM ve PAH olmayan hastalara göre fetuin-A seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir ve fetuin-A'nın kalsiyum ve fosforu serumda çözünür halde tutarak vasküler kalsifikasyondan korunmada önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür. (Zhou, Z. ve diğ., 2015). T2DM'li hastalarda fetuin-A'daki artış, fetuin-A'nın T2DM ve inflamasyon gibi metabolik sendromun patofizyolojisinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Ix, J.H. ve diğ., 2006). Buna paralel olarak, fetuin-A düzeylerinin hs-CRP düzeyleri ile ilişkili olduğu ve monosit ve adipositlerde sitokin ekspresyonunu desteklediği bulunmuştur (Hennige, A.M. ve diğ., 2008). Çalışmamızda, serum Fetuin-A düzeylerinin T2DM, DN, DR ve DNR'de kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığı ( $P \leq 0,05$ ) belirlenmiştir (Şekil 4.1). Ayrıca DNR'li hasta grubunda diğer hasta gruplarına göre serum fetuin-A seviyesinde önemli bir artış ( $P < 0,05$ ) olduğu görüldü.

## 5.3. Serum TNF- $\alpha$ Düzeyleri

TNF- $\alpha$ , patojen veya enfeksiyona karşı ilk savunma hattı olarak inflamatuvar olan makrofajlar tarafından salınır (Sethi, J.K., ve Hotamisligil, G.S., 2021). TNF- $\alpha$  bir adipokindir, insülin direncini artırır ve obezitenin neden olduğu T2DM ile ilişkilidir. TNF- $\alpha$ 'nın T2DM patogenezinde önemli bir rol oynadığı daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Rahman, M.H. ve diğ., 2016). Çalışmamızda, serum TNF- $\alpha$  düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla T2DM, DN, DR ve DNR'de önemli ölçüde arttığı ( $P \leq 0,05$ ) belirlendi, (Şekil 4.2). DNR grubu, diğer hasta gruplarına göre oldukça anlamlı bir farklılık gösterdi ( $P \leq 0,05$ ). Çalışmamızın sonuçları, artan TNF- $\alpha$ 'nın T2DM'yi artırdığını bildiren önceki çalışmaların sonuçları ile uyumludur.

## 5.4. Serum MMP-9 Seviyesi

Matris metalloproteinazlar (MMP'ler), kollajen, proteoglikanlar ve elastin gibi bağ dokusu proteinlerine karşı proteolitik aktiviteye sahip çinko bağımlı bir enzim ailesidir. MMP'lerin artan ekspresyonu ve aktivitesi, genel inflamasyon, tümör metastaz, solunum yolu hastalıkları, miyokard hasarı, vasküler anevrizmalar ve yeniden şekillenme gibi çeşitli patolojik süreçlerde tanımlanmıştır (Creemers, E.E. ve diğ., 2001). Vasküler yeniden

şekillenmedeki büyük önemlerinden dolayı, MMP'lerin ateroskleroz ve restenoz gibi kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynadığından şüphelenilmektedir (Galis, Z.S., ve Khatri, J.J., 2002). Diyabetin kalp, böbrek ve plazma dahil olmak üzere çeşitli dokularda MMP'leri aktive ettiği gösterilmiştir (Blankenberg, S. ve diğ., 2003). İnsan idrarındaki MMP-9, diyabetik nefropati ve idrar yolu enfeksiyonlarının bir belirteci olarak önerilmiştir (García-Tejeda, A.U. ve diğ., 2018). İnsan idrar tortusundaki MMP-9 (jelatinaz-B, makrofaj jelatinaz veya nötrofil jelatinaz) mRNA'sı, epitelyal-mezenkimal geçişin bir belirteci olarak önerilmiştir; bu, idrar albümin atılımı ve kan üre nitrojeni ile ilişkilidir ve diyabetikler için yüksek bir tanı değeri sunar. Üriner MMP-9'un diyabetik nefropatili hastalarda özellikle erken dönemde böbrek hasarının derecesini değerlendirmede faydalı olabileceği öne sürülmüştür (Tashiro, K. ve diğ., 2004). Çalışmamızda, T2DM, DN, DR ve DNR gruplarında, serum MMP-9 düzeylerinin kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde arttığını ( $P \leq 0,05$ ) belirledik (Şekil 4.3). Ayrıca, T2DM grubu olan hastalar, diğer hasta gruplarından büyük bir anlamlı farklılık sergilemiştir ( $P \leq 0,05$ ). Bu sonuçlar, MMP-9'un diyabet komplikasyonlarının görülme sıklığındaki önemli rolünün yanı sıra gelecekte MMP-9 inhibitörlerinin DM komplikasyonlarını azaltmak için kullanma olasılığını ortaya koymaktadır.

### 5.5. Serum dp-ucMGP Düzeyi

Tip 2 diyabette, dolaşımdaki dp-ucMGP seviyeleri makrovasküler komplikasyonlarla ilişkilidir (Liabeuf, S. ve diğ., 2014). Bununla birlikte, kardiyovasküler hastalıklar ve buna bağlı mortalite, dp-ucMGP genine bağlanmıştır (Liu, Y.P. ve diğ., 2015). Yüksek dp-ucMGP düzeylerinin, tip 2 diyabetiklerde, özellikle periferik arter hastalığı ve kalp yetmezliği kategorilerinde, yüksek kardiyovasküler hastalık riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Dalmeijer, W. ve diğ., 2013). Ayrıca, dp-ucMGP ile diyabetik periferik nöropatinin patofizyolojisi arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir (Göriz, C. ve diğ., 2007). Çalışmamızda, serum dp-ucMGP seviyeleri, kontrole kıyasla T2DM, DN, DR ve DNR gruplarında önemli ( $P < 0,05$ ) ölçüde azaldı, (Şekil 4.4). Kontrole kıyasla DNR'li hastalarda oldukça anlamlı bir düşüş gözlemlendi ( $P \leq 0,05$ ). Bu sonuçlar diğer çalışmalarla uyumludur. Ayrıca çalışmamızda dp-ucMGP ile K vitamini ve MMP-9 arasında anlamlı bir negatif korelasyon gözlemlendi ve bu da dp-ucMGP ile inflamasyon arasında bir bağlantı olduğunu düşündürdü, bu nedenle dp-ucMGP diyabetik komplikasyon riski taşıyan kişileri belirlemek için tercih edilen bir biyobelirteç olabilir.

## 5.6. Serum K Vitamini Düzeyleri

K vitamini, glisemik durumun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan yağda çözünen bir vitamindir. K vitamini takviyesi, diabetes mellitus riskini azaltabilir ve insülin duyarlılığını iyileştirebilir. Yapılan çalışmalarda K vitamini eksikliğinin diyabetik komplikasyonları geliştirme riskini arttırdığı gösterilmiş ve diyabetin zararlı etkilerini azaltmak için gelecekte K vitamini kullanmanın etkili bir strateji olduğu belirtilmiştir (Ho, H.J. ve diğ., 2020). Çalışmamızda T2DM, DN, DR ve DNR'li hastalarda serum K vitamini seviyeleri kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldı ( $P < 0,05$ ), (Şekil 4.5). DNR grubunda diğer hasta gruplarına göre K vitamin seviyesinde anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Ayrıca, DNR grubunda K vitamin seviyeleri ile dp-ucMGP arasında negatif korelasyon vardı (Şekil 4.6). Elde ettiğimiz bu sonuçlar K Vitamininin T2DM komplikasyonları için bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmadaki ana bulgulara göre, özetle aşağıdaki sonuçlara varıldı:

1. DN, DR ve DNR hasta gruplarında kontrol grubuna kıyasla yüksek fetuin-A seviyeleri görüldü, bu sonuç da fetuin-A'nın T2DM ve komplikasyonlarının patogenezinde rol oynayabileceğini görüşünü desteklemektedir.
2. T2DM patogenezinin indüklediği inflamatuvar yanıt nedeniyle hasta gruplarında serum TNF- $\alpha$  seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdi.
3. T2DM, DN, DR ve DNR'li hastalarda MMP-9 seviyelerinin yükselmesi, T2DM'de hücre dışı matris bozulmasını düşündürmektedir.
4. Kontrol grubuna kıyasla tüm hasta gruplarında düşük serum dp-ucMGP seviyeleri gözlenmiş olup, bu durum da diyabetiklerde arteriyel kalsifikasyondaki anormallikleri açıklayabilir.
5. T2DM, DN, DR ve DNR'li hastalarda K vitamini seviyesi önemli ölçüde azaldı ve bu sonuç K vitamininin mikrovasküler diyabetik komplikasyonların belirlenmesinde bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.
6. DNR grubunda dp-ucMGP ile MMP-9 ve K vitamini arasında negatif bir korelasyon gözlemlendi, bu sonuç T2DM komplikasyonlarının arteriyel sertlik ile ilişkili olabileceğini düşündürdü.

## KAYNAKLAR

- Akash, M.S.H. ve diğ., 2018, Tumor necrosis factor-alpha: role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, *Journal of Cellular Biochemistry*, 119 (1), 105-110.
- Akter, S. ve diğ., 2017, Smoking and the risk of type 2 diabetes in Japan: A systematic review and meta-analysis, *Journal of Epidemiology*, 27(12), 553-561.
- Alam, S. ve diğ., 2021, Diabetes mellitus: Insights from epidemiology, biochemistry, risk factors, diagnosis, complications and comprehensive management, *Diabetology*, 2 (2), 36-50.
- Alzamil, H., 2020, Elevated serum TNF- $\alpha$  is related to obesity in Type 2 diabetes, *Journal of Obesity*, 2020, 5076858.
- Amerikan Diyabet Derneği, 2015, Standards of medical care in diabetes-2015 abridged for primary care providers, *Clinical Diabetes*, 33(2), 97-111.
- Amerikan Diyabet Derneği, 2018, Standards of medical care in Diabetes-2018, <https://diabetesed.net/wp-content/uploads/2017/12/2018-ADA-Standards-of-Care.pdf>, [Ziyaret tarihi: 27.05.2022].
- Amerikan diyabet Derneği, 2019, 11. Microvascular complications and foot care: standards of medical care in diabetes—2019, *Diabetes Care*, 42(1), 124-138.
- Anderzén, J. ve diğ., 2016, Teenagers with poor metabolic control already have a higher risk of microvascular complications as young adults. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 30 (3), 533-536.
- Arboleda-Velasquez, J.F. ve diğ., 2015, From pathobiology to the targeting of pericytes for the treatment of diabetic retinopathy, *Current Diabetes Reports*, 15 (2), 573.
- Arslanian, S.A. ve diğ., 2018, Metabolic contrasts between youth and adults with impaired glucose tolerance or recently diagnosed type 2 diabetes: II. Observations using the oral glucose tolerance test, *Diabetes Care*, 41(8), 1707-1716.
- Baynest, H.W., 2015, Classification, pathophysiology, diagnosis and management of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Metabolism*, 6(5), 1000541.
- Berezin, A.E., 2016, Impaired Phenotype of Endothelial Cell-Derived Micro Particles: The Missed Link in Heart Failure Development, *Biomarkers Journal*, 2(2), 14.
- Blankenberg, S. ve diğ., 2003, Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease, *Circulation*, 107(12), 1579-1585.
- Boden, G., 2008, Obesity and free fatty acids, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 37(3), 635-646.
- Borrás, T. ve diğ., 2015, A novel Mgp-Cre knock-in mouse reveals an anticalcification/antistiffness candidate gene in the trabecular meshwork and peripapillary scleral region, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(4), 2203-2214.
- Callaghan, B.C. ve diğ., 2015, The importance of rare subtypes in diagnosis and treatment of peripheral neuropathy: a review, *JAMA Neurology*, 72(12), 1510-1518.
- Catalano, P.M., 2014, Trying to understand gestational diabetes, *Diabetic Medicine*, 31(3), 273-281.

- Chawla, A. ve diğ., 2016, Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: distinct or continuum, *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 20(4), 546-551.
- Chia, C.W. ve diğ., 2018, Age-Related Changes in Glucose Metabolism, Hyperglycemia, and Cardiovascular Risk, *Circulation Research*, 123 (7), 886-904.
- Corriere, M. ve diğ., 2013, Epidemiology of diabetes and diabetes complications in the elderly: an emerging public health burden, *Current Diabetes Reports*, 13(6), 805-813.
- Creemers, E.E. ve diğ., 2001, Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure, *Circulation Research*, 89, 201-210.
- Cruz, N.G. ve diğ., 2013, The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 99 (2), 85-92.
- Dalmeijer, G.W. ve diğ., 2012, The effect of menaquinone-7 supplementation on circulating species of matrix Gla protein, *Atherosclerosis*, 225(2), 397-402.
- Dalmeijer, W. ve diğ., 2013, Circulating matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification and vitamin K status in healthy women, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(4), 624-628.
- Das, A.K. ve diğ., 2019, Expert group consensus opinion: Role of anti-inflammatory agents in the management of type-2 diabetes (T2D), *Journal of Association of Physicians of India*, 67(12), 65-74.
- DeFronzo, R.A. ve diğ., 2015, Type 2 diabetes mellitus, *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 15019.
- Denecke, B. ve diğ., 2003, Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A, *Biochemical Journal*, 376(1), 135-145.
- Devarapalli, P. ve diğ., 2019, Patient education in management of diabetes with medical comorbidities: an interventional study in South-eastern India, *International Journal of Scientific Reports*, 5(1), 24-28.
- Diaz-Valencia, P.A. ve diğ., 2015, Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review, *BMC Public Health*, 17(15), 255.
- Durruty, P. ve diğ., 2014, Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus, <https://pdfs.semanticscholar.org/2ac4/73dcd467fa67a443ebc2fe92fe45701df8b7.pdf?ga=2.264586959.1368675765.1653646043-142402099.1648712631>, [Ziyaret tarihi: 27.05.2022].
- Ferland, G. ve diğ., 2016, Phylloquinone and menaquinone-4 tissue distribution at different life stages in male and female Sprague-Dawley rats fed different VK levels since weaning or subjected to a 40% calorie restriction since adulthood, *Nutrients*, 8(3), 139-141.
- Forbes, J.M. ve Cooper, M.E., 2013, Mechanisms of diabetic complications, *Physiological Reviews*, 93(1), 137-188.
- Fowler, M.J., 2008, Microvascular and macrovascular complications of diabetes, *Clinical Diabetes*, 26(2), 77-82.
- Fowler, M.J., 2011, Microvascular and macrovascular complications of diabetes, *Clinical Diabetes*, 29(3), 116-122.
- Fusaro, M. ve diğ., 2017, Vitamin K and bone, *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 14(2), 200-206.
- Galis, Z.S. ve Khatri, J.J., 2002, Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly, *Circulation Research*, 90(3), 251-262.

- García-Tejeda, A.U. ve diğ., 2018, Association of urinary activity of MMP-9 with renal impairment in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus, *PeerJ*, 6 (6), e6067.
- Gerich, J.E., 1998, The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity, *Endocrine Reviews*, 19(4), 491-503.
- Göritz, C. ve diğ., 2007, Glia-induced neuronal differentiation by transcriptional regulation, *Glia*, 55(11), 1108-1122.
- Guo, S. ve DiPietro, L.A., 2010, Factors affecting wound healing, *Journal of Dental Research*, 89(3), 219–229.
- Hennige, A.M. ve diğ., 2008, Fetuin-A induces cytokine expression and suppresses adiponectin production, *PloS One*, 3(3), 1752-1765.
- Hieronymus, L. ve Griffin, S., 2015, Role of amylin in type 1 and type 2 diabetes, *The Diabetes Educator*, 41(1), 47-56.
- Ho, H.J. ve diğ., 2020, Beneficial effects of vitamin k status on glycemic regulation and diabetes mellitus: A mini-review, *Nutrients*, 12(8), 2485.
- Ifeanyi, O.E. ve diğ., 2015, Review article review on immune mediated ( type 1 diabetes mellitus, insulin dependent diabetes mellitus (IDDM), *International Journal of Innovative and Applied Research*, 11, 24-32.
- Imamura, F. ve diğ., 2015, Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: Systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction, *BMJ Journal*, 351, h3576.
- Ix, J.H. ve diğ., 2006, Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: Data from the heart and soul study, *Circulation*, 113(14), 1760–1767.
- Jafaripour, S. ve diğ., 2020, Inflammation, diet, and type 2 diabetes: a mini-review, *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 41(4), 768–777.
- Jeannin, A. ve diğ., 2020, Inactive matrix gla protein plasma levels are associated with peripheral neuropathy in Type 2 diabetes, *PloS One*, 15(2), e0229145.
- Kahn, S.E. ve diğ., 2014, Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future, *The Lancet*, 383(9922), 1068–1083.
- Kandhasamy, J.P. ve Balamurali, S., 2015, Performance analysis of classifier models to predict diabetes mellitus, *Procedia Computer Science*, 47, 45–51.
- Kapruvan, N., 2016, Diabetes Mellitus : Classification, Symptoms and Management : A Review, <https://www.rroij.com/open-access/diabetes-mellitus-classification-symptoms-and-management-a-review-.pdf>, [Ziyaret tarihi: 27.05.2022].
- Kashim, R.M. ve diğ., 2018, Diabetic retinopathy screening: A systematic review on patients' non-attendance, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(1), 157.
- Klemis, V. ve diğ., 2017, Circulating fibronectin contributes to mesangial expansion in a murine model of type 1 diabetes, *Kidney International*, 91(6), 1374–1385.
- Kopel, J. ve diğ., 2019, Evolving spectrum of diabetic nephropathy., *World Journal of Diabetes*, 10(5), 269-279.
- Li, H. ve diğ., 2011, Alcohol consumption and risk of type 2 diabetes in Mongolian population, inner Mongolia China, *Journal of Diabetes and Metabolism*, 2(1), 1000116.
- Liabeuf, S. ve diğ., 2014, Vascular calcification in patients with type 2 diabetes: the involvement of matrix Gla protein, *Cardiovascular Diabetology*, 13, 85.
- Lim, A.K.H., 2014, Diabetic nephropathy-Complications and treatment, *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 7, 361-381.
- Liu, C. ve diğ., 2016, Adiponectin, TNF- $\alpha$  and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis, *Cytokine*, 86, 100-109.

- Liu, Y.P. ve diğ., 2015, Inactive matrix Gla protein is causally related to adverse health outcomes: a Mendelian randomization study in a Flemish population, *Hypertension*, 65(2), 463-470.
- Lopez-Revuelta, K. ve diğ., 2015. Diabetic nephropathy without diabetes, *Journal of Clinical Medicine*, 4(7), 1403-1427.
- Lotfy, M. ve diğ., 2016, Chronic Complications of Diabetes Mellitus: A Mini Review. *Current Diabetes Reviews*, 13(1), 3-10.
- Manna, P., ve Kalita, J., 2016, Beneficial role of vitamin K supplementation on insulin sensitivity, glucose metabolism, and the reduced risk of type 2 diabetes: A review, *Nutrition*, 32(7-8), 732-739.
- Martins, V. L. ve diğ., 2013, Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and Tissue Research*, 351(2), 255–268.
- Mayorov, A.Y., 2011, Insulin resistance in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, *Diabetes Mellitus*, 14(1), 35–45.
- McIntyre, H.D. ve diğ., 2019, Gestational diabetes mellitus, *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 47.
- Ng, L.C. ve Gupta, M., 2020, Transdermal drug delivery systems in diabetes management: A review, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 13–25.
- Ojha, A. ve diğ., 2019, Current perspective on the role of insulin and glucagon in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus, *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 11, 57-65.
- Okur, M.E. ve diğ., 2017, Diabetes mellitus: A review on pathophysiology, current status of oral medications and future perspectives, *Acta Pharmaceutica Scientia*, 55(1), 61–82.
- Olokoba, A.B. ve diğ., 2012, Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends, *Oman Medical Journal*, 27(4), 269–273.
- Padhi, S. ve diğ., 2020, Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics, *In Biomedicine and Pharmacotherapy*, 131, 110708.
- Pickering, R.J. ve diğ., 2018, Recent novel approaches to limit oxidative stress and inflammation in diabetic complications, *Clinical and Translational Immunology*, 7(4), e1016.
- Pihoker, C. ve diğ., 2018, ISPAD clinical practice consensus guidelines 2018: The delivery of ambulatory diabetes care to children and adolescents with diabetes, *Pediatric Diabetes*, 27, 84–104.
- Pop-Busui, R. ve diğ., 2017, Diabetic neuropathy: A position statement by the American diabetes association, *Diabetes Care*, 40(1), 136–154.
- Rafieian-Kopaei, M. ve diğ., 2014, Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes, *International Journal of Preventive Medicine*, 5(8), 927-946.
- Rahman, M.H. ve diğ., 2016, Evolving insights into the pathophysiology of diabetic neuropathy: implications of malfunctioning glia and discovery of novel therapeutic targets, *Current Pharmaceutical Design*, 22(6), 738-757.
- Rasekhi, H. ve diğ., 2015, The effect of vitamin K1 supplementation on sensitivity and insulin resistance via osteocalcin in prediabetic women: A double-blind randomized controlled clinical trial, *European Journal of Clinical Nutrition*, 69, 891-895.
- Reddy, M.A. ve diğ., 2013, Epigenetic modifications in the pathogenesis of diabetic nephropathy, *Seminars in Nephrology*, 33(4), 341-353.
- Romero-Aroca, P. ve diğ., 2016, Diabetic macular edema pathophysiology: vasogenic versus inflammatory, *Journal of Diabetes Research*, 2016, 2156273

- Roumeliotis, S. ve diğ., 2019, Association of the Inactive Circulating Matrix Gla Protein with Vitamin K Intake , Calcification , Mortality , and Cardiovascular Disease : A Review, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 628.
- Schäfer, C. ve diğ., 2003, The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification, *Journal of Clinical Investigation*, 112(3), 357–366.
- Schurgers, L.J. ve diğ., 2013, Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: a crucial switch to control ectopic mineralization, *Trends in Molecular Medicine*, 19(4), 217–226.
- Sears, B. ve Perry, M., 2015, The role of fatty acids in insulin resistance, *Lipids in Health and Disease*, 14, 121.
- Sethi, J.K. ve Hotamisligil, G.S., 2021, Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nature Metabolism*, 3(10), 1302-1312.
- Shah, A.D. ve diğ., 2015, Type 2 diabetes and incidence of a wide range of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people, *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 3(2), 105-113.
- Sherwani, S.I. ve diğ., 2016, Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients, *Biomarker Insights*, 11, 95-104.
- Siu, A.L., 2015, Screening for abnormal blood glucose and type 2 diabetes mellitus: US Preventive Services Task Force recommendation statement, *Annals of Internal Medicine*, 163(11), 861-868.
- Srinivas, P.R. ve diğ., 1993, Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level, *Molecular Endocrinology*, 7(11), 1445-1455.
- Stringer, D.M. ve diğ., 2015, Glucose transporters: Cellular links to hyperglycemia in insulin resistance and diabetes, *Nutrition Reviews*, 73(3), 140-154.
- Swaroop, J.J. ve diğ., 2012, Association of TNF- $\alpha$  with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus, *Indian Journal of Medical Research*, 135(1), 127–130.
- Tashiro, K. ve diğ., Levels of urinary matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 18(3), 206–210.
- Taylor, R., 2013, Type 2 diabetes: Etiology and reversibility. *Diabetes Care*, 36(4), 1047-1055.
- Tosur, M. ve diğ., 2020, Medication-induced hyperglycemia: pediatric perspective. *BMJ Open Diabetes research and Care*, 8(1)e000801.
- Toth-Manikowski, S. ve Atta, M. G., 2015, Diabetic kidney disease: Pathophysiology and therapeutic targets, *Journal of Diabetes Research*, 2015, 697010.
- Tuñón-Le Poultel, D. ve diğ., 2014, Association of matrix Gla protein gene functional polymorphisms with loss of bone mineral density and progression of aortic calcification, *Osteoporosis International*, 25(4) 1237-1246.
- Umpierrez, G. ve Korytkowski, M., 2016, Diabetic emergencies-ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia, *Nature Reviews Endocrinology*, 12(4), 222-232.
- Victoria, H. ve diğ., 2019, Diabetes in Sub Saharan Africa 1999-2011: Epidemiology and public health implications. a systematic review, *BMC Public Health*, 11, 564.
- Vitlianova, K. ve diğ., 2015, Blood pressure control predicts plasma matrix metalloproteinase-9 in diabetes mellitus type II, *Archives of Medical Science*, 11(1), 85–91.

- Wang, C. ve diğ., 2019, Novel associations between sex hormones and diabetic vascular complications in men and postmenopausal women: a cross-sectional study, *Cardiovascular Diabetology*, 18, 97.
- Wang, X. ve diğ., 2013, Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis, *Diabetes Care*, 36(1), 166–175.
- Wei, F.F. ve diğ., 2018, Inactive matrix Gla protein is a novel circulating biomarker predicting retinal arteriolar narrowing in humans, *Scientific Reports*, 8, 15088.
- Weikert, C. ve diğ., 2008, Plasma fetuin-A levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke, *Circulation*, 118(24), 2555–2562.
- Wong, H. ve diğ., 2019, The Effects of Mental Stress on Non-insulin-dependent Diabetes: Determining the Relationship Between Catecholamine and Adrenergic Signals from Stress, Anxiety, and Depression on the Physiological Changes in the Pancreatic Hormone Secretion. *Cureus*. 11 (8):e5474.
- Yadav, S.S. ve diğ., 2014, Significance of impaired serum gelatinases activities in metabolic syndrome, *Toxicology International*, 21(1), 107-111.
- Yilmaz, A. ve diğ., 2018, Elevated serum fetuin-A levels are associated with grades of retinopathy in type 2 diabetic patients, *International Ophthalmology*, 38, 2445-2450.
- Zhou, Z. ve diğ., 2015, Serum fetuin-A concentrations are positively associated with serum VEGF levels in patients with newly diagnosed type 2 diabetes, *Endocrine Journal*, 62(10), 879-885.
- Zürbig, P. ve diğ., 2019, CKD273 enables efficient prediction of diabetic nephropathy in nonalbuminuric patients, *Diabetes Care*, 42( 1), 4–5.

## Ek 1. Etik kurul Raporu



Republic of Iraq  
Ministry of Health/Environment.

**Consent form of a research project**  
The initial Consent form of a research project to collect the samples from Ministry of Health  
website [www.moh.gov.iq](http://www.moh.gov.iq)

Title in English language:

**Inactive Vitamin K-Dependent Matrix Gla Proteins and feutin as Potential Biomarkers of inflammatory damage in micro vascular complication of type2 diabetes**

### 1- Details of the main author/researcher:

| Name                     | The scientific title/ Career Title | Work address                                                                                     | Phone number    | Email                    |
|--------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| Jasim Awad Abdoualnaylee | Master student                     | Kirsehir Ahi Evran University<br>Faculty of Seince and Literature<br>The Department of chemistry | 009647733616648 | jassimalshmr08@gmail.com |

### 2- Details of the contributed author/researcher:

| Name                            | The scientific title/ Career Title                        | Work address                                                                      | Phone number    | Email                                          |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------|
| Anwar jasib Thaaban Almzaie     | Assistant prof/ Doctor/ lecturer of clinical Biochemistry | University of Al-Qadisiyah college of medicine department of medical chemistry    | 009647818734155 | Anwar.almzaie@qu.edu.iq<br>vipvip128@yahoo.com |
| Assistant. Prof. Dr. zuhal Alim | Assistant prof Doctor, lecturer of Biochemistry           | KIRSEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ<br>FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ<br>KİMYA ANABİLİM DALI | 00905445518123  | zuhal.alim@ahievran.edu.tr                     |

**The Scientific Supervisor/ if found**

| Name | The scientific title/ Career Title | Work address | Phone number | Email |
|------|------------------------------------|--------------|--------------|-------|
| None |                                    |              |              |       |

**A. Work background:**

Mechanisms involved in microvascular complication of type 2 DM are not clearly understood chronic hyperglycemia lead to oxidative stress, inflammation, mitochondrial and endothelial dysfunction. These events associated with vascular damage and calcification. Arterial calcification is a hallmark of vascular disease. MGP acts as a local inhibitor of calcification.

**B. The importance of the research and its objectives:**

To investigate the serum levels of the inactive form of MGP (dephospho-uncarboxylated MGP (dP-ucMGP), and its association with vit-K and inflammatory response in patients with microvasculare complication of type 2 DM

**C. Conclusion:**

The study may suggest that increase inactive MGP protein level and expression may enhance vascular calcification in type 2 DM via inflammatory mechanisms and poor vascular vitamin K status.

**3- People or martials that are required for this research from the Ministry of Health.?**

| Martials                                                                                                                 | Type                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Laboratories samples from the Type 2 diabetes patients with and without microvascular complication and healthy subjects) | blood samples, BMI and Blood pressure measurements                                                                                             |
| Martials/ equipment's                                                                                                    | Centrifuge, deep freezer, spectrophotometer, ELISA, RT-PCR instruments and ELISA kits                                                          |
| information from the patients Records                                                                                    | Consent forms of patients , type of treatment, medical history of patients                                                                     |
| Patients or other staff members                                                                                          | this study will be conducted on 160 patients with Type 2 diabetes patients with and without microvascular complication and 40 healthy subjects |
| Others                                                                                                                   | No                                                                                                                                             |

4- Time and the date to perform the research: (suggested locations)

Time: 1<sup>st</sup> April 2021- 1<sup>st</sup> Jun 2022.

Locations:

| Name of institute                                                                                                                                                               | Approval |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Clinical chemistry lab in Al-Diwaniyah teaching hospital /Iraq, and clinical biochemistry lab in department of medical chemistry college of medicine University of Al-Qadisiyah |          |
|                                                                                                                                                                                 |          |

5- Fund: None.

6- Methodology:

a. **Study design:** case-control study

**B. Case definition and exclusion criteria for negative tests and sampling methods were considered.**

this study will be conducted on 160 patients The subjects will be divided into four groups of 40 subjects each, (Type 2 diabetes patients with no microvascular complication Type 2 DM (N=40), Type 2 diabetes patients with nephropathy DN(N=40) Type 2 diabetes patients with retinopathy DR(N=40), Type 2 diabetes patients with neuropathy DNR (N=40) and 40 healthy subjects as control.

Patients with systemic conditions such, respiratory diseases, renal disease, liver disease, and rheumatoid arthritis, will be excluded from the present investigations.

**C. Physiological and biochemical parameters were measured.**

Serum inactive MGP, Vit-K, Feutin, TNF-  $\alpha$  and MPP-9, will be measured by ELISA. qPCR will be applied for gene expression of dP-ucMGP

**D- The expected number of samples to be taken:**

This study will be conducted on 160 patients The subjects will be divided into four groups of 40 subjects each and 40 healthy subjects as control

**E- Statistical analysis:**

All data will be analysed using SPSS software Data will be expressed as means  $\pm$  SEM. ANOVA (one-way or two-way ANOVA) or Kruskal-Wallis test will be performed as appropriate to determine significant differences between groups. After ANOVA, *post hoc* analysis using Tukey's test will be carried out. A *P* value of  $< 0.05$  will be considered significant throughout

**F- Ethical considerations during the research:**

-The scientific Committee's acceptance by the medical college (University of Al-Qadisiyah, Iraq) and department of clinical chemistry at the same institution.

-Scientific Committee approval of Al- Al-Diwaniyah teaching hospital in Al-Qadisiyah province, Al-Diwaniyah city.

-All participants in the present study will be clarified in order to obtain verbal recognition by the goals and methods of study.

#### **A. Signed Commitment:**

This is **Jasim Awad Abdoualnaylee** I signed below to commit that I perform the research according to this protocol. Also, I commit that I will never change or modify it after it is being approved unless agreed with research committee in the health institute. Moreover, I commit following the laws, rules and instructions of Iraqi health ministry and any other official parties that follow the scientific and ethical commitment for research.

Name and the signature of the main researcher: **Jasim Awad Abdoualnaylee**

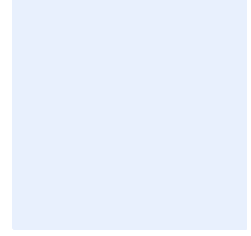
The name and the signature of the supervisor/ if the research is performed to obtain a BSc, MSc or PhD etc: None.

**Ass.Prof. Dr.Anwar jasib thaaban almzaiel**

Approval of the research committee at the health institution (or the body authorized to approve this form)

## ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler |                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Adı Soyadı       | Jasim Awad Abdoun ALNAYLEE                                               |
| Doğum Yeri       |                                                                          |
| Doğum Tarihi     |                                                                          |
| Uyruğu           | <input type="checkbox"/> T.C. <input checked="" type="checkbox"/> Diğer: |



| Eğitim Bilgileri |                           |
|------------------|---------------------------|
| Lisans           |                           |
| Üniversite       | Al-Qadisiyah Üniversitesi |
| Fakülte          | Fen Fakültesi             |
| Bölümü           | Kimya                     |
| Mezuniyet Yılı   |                           |

| Yüksek Lisans    |                                 |
|------------------|---------------------------------|
| Üniversite       | Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi |
| Enstitü Adı      | Fen Bilimleri Enstitüsü         |
| Anabilim Dalı    | Kimya                           |
| Programı         | Biyokimya                       |
| Mezuniyet Tarihi | 2020-Halen                      |