



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



İKİ ÖNEMLİ DİYABET KOMPLİKASYONUNUN NRF2 GEN POLİMORFİZMLERİ İLE İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Doktora Tezi

Aygül ÇELTİK

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**İKİ ÖNEMLİ DİYABET KOMPLİKASYONUNUN
NRF2 GEN POLİMORFİZMLERİ İLE İLİŞKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Aygül ÇELTİK

Danışman
Doç. Dr. Fatma Zuhale EROĞLU

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

İzmir
2022

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Fatma Zuhal EROĞLU

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ

Üye : Prof. Dr. M. Özgür ÇOĞULU

Üye : Doç. Dr. Aslı TETİK VARDARLI

Üye : Doç. Dr. Nilüfer ÖZDEMİR

Üye : Dr. Öğr. Ü. Zekeriya DÜZGÜN

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Ege Üniversitesi Nefroloji Bilim Dalında yan dal asistanı olarak görev yaptığım sırada moleküler biyolojinin özellikle insan sağlığı açısından ne kadar önemli olduğunu fark etmeye başlamam ile birlikte doktora sürecim de başlamış oldu. Hem günümüzün en önemli hastalıklarından biri olması hem de böbrek hastalıklarının en önemli sebeplerinden biri olması nedeni ile diyabetik böbrek hastalıklarıyla ilgili moleküler araştırmalar yapmak istedim. Doktora sürecim sayın danışman hocam Doç. Dr. Zuhal Eroğlu'nun olağanüstü destekleri ile gerçekleşmiştir.

Bir halk sağlığı sorunu haline gelen diyabetin neden olduğu komplikasyonların temelinde yatan moleküler mekanizmaların ortaya konulması tanı ve tedavi açısından oldukça önemlidir. Bu tezdeki amacımız diyabetin iki önemli mikrovasküler komplikasyonuna neden olabilecek bazı polimorfizmlerin belirlenmesini araştırmaktı.

Bu tez çalışması Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiş olup, BAP birimine desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 2.08.2022

Dr. Aygöl ÇELTİK

Özet

İki Önemli Diyabet Komplikasyonunun Nrf2 Gen Polimorfizmleri İle İlişkisinin Değerlendirilmesi

Giriş: Oksidatif stres, tip 2 diabetes mellitusun (T2DM) mikrovasküler komplikasyonlarının patogeneğinde rol almaktadır. Nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), oksidatif strese yanıt olarak antioksidan genlerin ekspresyonunu regüle eden önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf2' nin promotör bölgesindeki polimorfizmlerin bazı hastalıklar ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Amacımız, T2DM olan hastalarda Nrf2 geninin promotör bölgesinde yer alan rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A) ve rs6721961 (T>G) polimorfizmlerinin diyabetik nefropati (DNP) ve diyabetik ayak ülserleri (DAÜ) gelişimi ile ilişkisinin irdelenmesidir.

Yöntem: Çalışma grubu, DNP' si olan 110 hasta ve DAÜ olan 60 hastadan, kontrol grubu ise DNP ve DAÜ olmayan 90 hastasından oluşturulmuştur. Tüm hastaların T2DM' si vardır. Kişilerden alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra Nrf2 geni promotör bölgesinde bulunan rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A) ve rs6721961 (T>G) polimorfizmleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile çoğaltılarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: DNP grubunun yaşı ve diyabet süresi kontrol grubu ile kıyaslandığında daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,039$ ve $p=0,042$). Kontrol grubu ile DNP grubu karşılaştırıldığında, DNP grubunda tahmini glomeruler filtrasyon hızı (tGFH) daha düşük ($p<0,001$) ve albüminüri düzeyi daha yüksek bulundu ($p<0,001$). DNP ile kontrol grubu rs35652124 (T>C) ve rs6721961 (T>G) polimorfizmleri açısından incelendiğinde genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak bir benzerlik bulunuyorken (sırasıyla $p=0,192$ ve $p=0,072$) rs6706649 (G>A) genotip dağılımı bakımından ise aralarında anlamlı bir farklılığın olduğu belirlendi ($p=0,048$). rs6706649 (G>A) polimorfizmi DNP riski için incelendiğinde Wild-type olan GG genotipi GA genotipi ile kıyaslandığında sadece GA genotipinin DNP riskini arttırabildiği ($\text{Exp(B)}=2,888$, %95 Güven aralığı 0,160-7,189, $p=0,023$) gösterildi. rs6721961 (T>G) ve rs35652124 (T>C) polimorfizmlerinin DNP açısından bir risk faktörü olamayacağı vurgulandı.

DAÜ grubundaki hastaların yaşı ve DM süresi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek olarak bulundu (sırasıyla $p=0,013$ ve $p=0,006$). Ayrıca bu hastalarda

biyokimyasal verileri kontrol grubu ile kıyaslandığında HbA1c düzeyinin daha yüksek, tGFH' nin daha düşük ve albüminüri düzeyinin ise daha yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,001$ ve $p<0,001$). DAÜ olan hastalar çalışılan polimorfizmler açısından kontrol grubu ile kıyaslandığında rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A) ve rs6721961 (T>G) polimorfizmlerin genotip dağılımları arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi (sırasıyla $p=0,118$, $0,625$ ve $p=0,196$). Bu üç polimorfizmin DAÜ için risk faktörü olmadığı gözlemlendi.

Sonuç: Çalışma bulgularımıza göre rs6706649 (G>A) polimorfizminin GA genotipinin DNP riskini arttırabilmekte iken rs35652124 (T>C) ve rs6721961 (T>G) polimorfizmlerinin DNP gelişimi ile ilişkili olmadığı belirlendi. Diğer yandan bu polimorfizminin DAÜ riski üzerine etkisi olmadığı gözlemlendi.

Anahtar kelimeler; diyabetik ayak ülseri, diyabetik nefropati, nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2, oksidatif stres, polimorfizm

Abstract

Evaluation of Relationship between Nrf2 Polymorphisms and Two Important Microvascular Complications of Diabetes Mellitus

Introduction: Oxidative stress participates in the pathogenesis of microvascular complications of type 2 diabetes mellitus (T2DM). Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) is a transcription factor that regulates the expression of antioxidant genes in response to oxidative stress. Polymorphisms in the promoter region of Nrf2 have been shown to be associated with various diseases. Our aim is to evaluate the association of rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A), rs6721961 (T>G) single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the Nrf2 gene with diabetic nephropathy (DNP) and diabetic foot ulcers (DFU) in patients with T2DM.

Methods: The study included 110 patients with DNP and 60 patients with DFU. As control group, diabetic patients without DNP and DFU (n=90) were enrolled. All patients had T2DM. After DNA isolation, single nucleotide polymorphisms were studied by polymerase chain reaction.

Results: Patients in DNP group were older ($p=0,039$) and had longer duration of diabetes ($p=0,042$) than patients in control group. When compared to the control group, DNP group had lower estimated glomerular filtration rate (eGFR) ($p<0,001$) and higher albuminuria level ($p<0,001$). The genotype distribution of rs35652124 (T>C) and rs6721961 (T>G) was not different between patients with DNP and patients in the control group ($p=0,192$ and $p=0,072$, respectively). The distribution of rs6706649 (G>A) genotypes was statistically different among patients with DNP and the control group ($p=0,048$). When rs6706649 (G>A) polymorphism was evaluated, only GA genotype was shown to increase the risk of DNP ($\text{Exp(B)}=2,888$, 95% CI 0,160-7,189, $p=0,023$) when compared to GG genotype.

Patients with DFU were older and had longer duration of diabetes than patients in the control group ($p=0,013$ and $p=0,006$, respectively). Patients with DFU had higher HbA1c, lower eGFR and higher albuminuria level when compared to the control group ($p=0,003$, $p=0,001$ and $p<0,001$, respectively). The frequencies of genotypes of rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A) and rs6721961 (T>G) were similar between patients with DFU and the control group ($p=0,118$, 0,625 and $p=0,196$, respectively). These polymorphisms were not associated with DFU.

Conclusion: While rs6706649 (G>A) polymorphism GA genotype was a risk factor for DNP, no association was found between rs35652124 (T>C) and rs6721961 (T>G) polymorphisms and DNP. These polymorphisms were not associated with DFU.

Keywords; diabetic foot ulcer; diabetic nephropathy; Nuclear factor E2-related factor 2; oxidative stress; polymorphism

İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini	X
Kısaltma Listesi	XI
1. Giriş	1
1.1. Araştırmanın Problemi	1
1.2. Araştırmanın Sorusu.....	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	2
1.4. Araştırmanın Varsayımları	2
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	3
2. Genel Bilgiler	4
2.1. Tip 2 Diyabetes Mellitus	4
2.1.1. Tanım ve epidemiyoloji	4
2.1.2 Mikrovasküler komplikasyonlar	4
2.1.2.1 Diyabetik nefropati	5
2.1.2.2 Diyabetik nöropati	6
2.1.2.3 Diyabetik ayak ülserleri	6
2.1.3 Mikrovasküler hasarın moleküler mekanizmaları	7
2.1.3.1 Diaçilgliserol/protein kinaz C aktivasyonu.....	8
2.1.3.2 Poliyol yolağı aktivasyonu.....	8
2.1.3.3 İleri glikasyon son ürünleri	8
2.1.3.4 Oksidatif stres	9
2.2 Keap1/Nrf2/ARE yolağı.....	9
2.2.1 Keap1/Nrf2/ARE yolağı ve T2DM	11
2.2.1.1 Keap1/Nrf2/ARE yolağı ve diyabetik nefropati	11
2.2.1.2 Keap1/Nrf2/ARE yolağı ve diyabetik ayak ülserleri	12
2.2.1.3 Keap1/Nrf2/ARE yolağı ve diyabetik nöropati	12
2.2.2 Nrf2 gen polimorfizmleri ile hastalıkların ilişkisi	12

3. Gereç ve Yöntem	14
3.1 Laboratuvar çalışması.....	15
3.2 İstatiksel analiz	19
4. Bulgular.....	20
4.1 Kontrol grubu ve DNP grubunun demografik, klinik ve laboratuvar bulgularının değerlendirilmesi	20
4.2 Kontrol grubu ve DAÜ grubunun demografik, klinik ve laboratuvar bulgularının değerlendirilmesi	29
5. Tartışma	33
6. Sonuç ve Öneriler	41
Kaynaklar	42
Ekler	56
Teşekkür	63
Özgeçmiş	64

Tablolar Dizini

- Tablo 1.** Kontrol grubunun ve DNP grubunu oluşturan mikroalbüminüri, makroalbüminüri ve düşük tGFH gruplarının tanımları
- Tablo 2.** Tek rhAmp tek nükleotid polimorfizmi genotipleme reaksiyonu karışımının bileşenleri (5 µL reaksiyon hacmi için)
- Tablo 3.** Tek nükleotid polimorfizmi genotipleme için termal döngü parametreleri
- Tablo 4.** Kontrol grubu ve DNP grubunun demografik ve klinik özellikleri
- Tablo 5.** Kontrol grubu ve DNP grubunun laboratuvar bulguları
- Tablo 6.** DNP grubunu oluşturan mikroalbüminüri, makroalbüminüri ve düşük tGFH gruplarının demografik ve klinik özellikleri
- Tablo 7.** DNP grubunu oluşturan mikroalbüminüri, makroalbüminüri ve düşük tGFH gruplarının laboratuvar bulguları
- Tablo 8.** Kontrol grubu ve DNP grubunda Nrf2 rs35652124 (T>C) polimorfizminin genotip dağılımı
- Tablo 9.** Kontrol grubu ve DNP grubunda Nrf2 rs6706649 (G>A) polimorfizminin genotip dağılımı
- Tablo 10.** Kontrol grubu ve DNP grubunda Nrf2 s6721961 (T>G) polimorfizminin genotip dağılımı
- Tablo 11.** Kontrol grubu ve DAÜ grubunun demografik ve klinik özellikleri
- Tablo 12.** Kontrol grubu ve DAÜ grubunun laboratuvar bulguları
- Tablo 13.** Kontrol grubu ve DAÜ grubunda Nrf2 rs35652124 (T>C) polimorfizminin genotip dağılımı
- Tablo 14.** Kontrol grubu ve DAÜ grubunda Nrf2 rs6706649 (G>A) polimorfizminin genotip dağılımı
- Tablo 15.** Kontrol grubu ve DAÜ grubunda Nrf2 s6721961 (T>G) polimorfizminin genotip dağılımı

Şekiller Dizini

- Şekil 1.** Mikrovasküler komplikasyonların patogeneğinde hipergliseminin rolü
- Şekil 2.** İnsan Nrf2 geni, mRNA ve proteini
- Şekil 3.** Keap1/Nrf2/ARE yolağı

Kısaltma Listesi

AKG	: Açlık kan glukozu
ARE	: Antioksidan cevap elementi
CKD-EPI	: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CNC-bZIP	: Cap'n'collar family of basic leucine-zipper
DAG	: Diaçilgliserol
DAÜ	: Diyabetik ayak ülserleri
DKB	: Diastolik kan basıncı
DM	: Diyabetes mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNP	: Diyabetik nefropati
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
GFH	: Glomerüler filtrasyon hızı
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HT	: Hipertansiyon
İGS	: İleri glikasyon son ürünleri
KB	: Kan basıncı
KBH	: Kronik böbrek hastalığı
Keap1	: Kelch-like ECH-associated protein 1
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein

Neh	: NRF2-ECH homology
NF-kB	: Nükleer faktor kappa B
Nrf2	: Nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2
OAB	: Ortalama arteriyel basıncı
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PKC	: Protein kinaz C
rhAmp PCR	: RNaz H bağımlı PCR
SKB	: Sistolik kan basıncı
SPSS	: Statistical Package of Social Science
T2DM	: Tip 2 diyabetes mellitus
tGFH	: Tahmini glomerüler filtrasyon hızı
TGF-�1	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1
VKİ	: Vücut kitle indeksi

1. Giriş

1.1 Araştırmanın Problemi

Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM), insülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon bozukluğu ile karakterize bir metabolik hastalık olup olguların %90' ında görüldüğünden en sık gözlenen diyabet tipi olarak tanımlanmaktadır (Saeedi et al., 2019; "Standards of Medical Care in Diabetes-2021," 2021; "Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu, 2020,").

Diyabetik hastalarda vasküler komplikasyonlar morbidite ve mortalitenin majör nedenleri arasındadır. Diyabetik nefropati (DNP) ise diyabetin uzun vadeli komplikasyonlarının en önemlilerinden biridir. DNP, son dönem böbrek hastalığına neden olmakla birlikte kardiyovasküler hastalık riskini arttırabilmektedir. Hastaların başka bir bireye bağımlı hale gelmesine ve yaşam kalitesinin azalmasına neden olan diğer bir komplikasyon da diyabetik ayak ülserleridir (DAÜ). Diyabetik hastaların yaklaşık dörtte biri yaşam boyu DAÜ komplikasyonu riski ile karşı karşıya kalmaktadır (Boulton et al., 2008; Fox et al., 2012; Hicks et al., 2016; Khan et al., 2020; Robbins et al., 2008; "Standards of Medical Care in Diabetes-2021," 2021; Wyld et al., 2021).

Oksidatif stres, diyabet komplikasyonlarının patogenezinde yer alan önemli mekanizmalardan biridir. Hücre içi artmış glukoz çeşitli yollar üzerinden oksidatif stresi arttırabilmektedir. Nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), hücrede oksidatif stres oluştuğunda antioksidan enzimlerin ve faz 2 detoksifiye edici enzimlerin gen transkripsiyonlarının aktivasyonunu sağlayarak hücreyi oksidatif hasara karşı korumaya çalışan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf2, otofaji, inflamasyon, endoplazmik retikulum stresi, apoptoz gibi olayların oluşumunda ve birçok sinyal yolağında rol alan proteinlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (McMahon, Itoh, Yamamoto, & Hayes, 2003; Nguyen, Nioi, & Pickett, 2009; D. D. Zhang, Hannink, & biology, 2003). Diyabetin neden olduğu komplikasyonların gelişiminde Nrf2'nin rolü birçok in vivo ve in vitro çalışmanın yanı sıra birkaç klinik çalışmada da gösterilmiştir (Hong et al., 2012; W. Li et al., 2014; Long et al., 2016; Zheng et al., 2011). Ayrıca, Nrf2' nin bazı polimorfizmlerinin redoks homeostazı ile ilgili anahtar genleri düzenlemesi nedeniyle DNP ve DAÜ' nün patogenezinde predispozan bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir.

1.2 Araştırmanın Sorusu

DNP ve DAÜ' nün patogeneğinde oksidatif stres önemli bir rol oynamaktadır. Glisemik ortam, hücre içi oksidatif stresin artmasına neden olarak diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının oluşmasına katkıda bulunabilmektedir. Nrf2, hücrelerde oksidatif stres oluştuğunda antioksidan enzimlerin transkripsiyonunu sağlayan önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda, Nrf2' nin diyabetin mikrovasküler komplikasyonları ile ilişkili olabileceği ortaya konulmuştur.

1.3 Araştırmanın Hipotezleri

Nrf2 geninin promotör bölgesindeki polimorfizmlerin redoks hemostazı ile ilgili genlerin transkripsiyonun etkileyerek diyabetik nefropati ve diyabetik ayak ülseri gelişimine yatkınlığa neden olabileceği düşünülmektedir. Nrf2 geninin promotör bölgesinde yer alan rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A), rs6721961 (T>G) gen polimorfizmlerini taşıyan T2DM hastalarda, hiperglisemi sırasında hücre içi oksidatif stres artışına bağlı olarak Nrf2' nin düzenlediği hücre içi antioksidan enzimlerin transkripsiyonlarının etkilenebileceği ve dolayısıyla DNP ve DAÜ gelişiminde rol alabilecekleri öngörülmüştür.

1.4 Araştırmanın Varsayımları

Araştırmadaki varsayımımız, Nrf2 geninin promotör bölgesindeki rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A), rs6721961 (T>G) polimorfizmlerinin DNP ve DAÜ olan hastalarda, bu komplikasyonların olmadığı diyabetik hastalara göre gen ifadelerinde değişimlerin olabileceğidir.

1.5 Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızın sınırlılıklarından biri DNP tanısının klinik olarak konulmasındaki güçlük olmuştur. Glomerüler hastalıkların kesin tanısı için böbrek biyopsisi ile histopatolojik inceleme yapılmalıdır. Fakat DNP tanısı çoğunlukla böbrek işlevleri ve idrarla albümin atılımı ile değerlendirilmektedir. Diğer bir kısıtlılık ilgili

polimorfizmlerin toplumumuzdaki sıklığının bilinmemesidir. Ayrıca çalışmamıza dahil edilen hasta sayısının az olması da diğer bir kısıtlılığımızdır.

1.6 Araştırmanın Amacı

Tüm dünyada sıklığı hızla artmakta olan ve ciddi morbidite ve mortaliteye sebep olan T2DM' in mikrovasküler komplikasyonların patogeneğinde multifaktöriyel etmenler rol oynamakta ve bu mekanizmaları birbirinden ayrılmasında güçlük çekilmektedir. Oksidatif stres bu mekanizmalardan en önemlilerinden biridir. Hücrede, hücre içi artmış glukozun metabolize edilmesi için yönlendirildiği çeşitli yollar üzerinden oksidatif stres artmaktadır. Nrf2, oksidatif stres oluştuğunda antioksidan enzimlerin ve faz 2 detoksifiye edici enzimlerin gen transkripsiyonlarının aktivasyonunu sağlayan önemli bir transkripsiyon faktörü olup hücreyi oksidatif hasara karşı korumaya çalışmaktadır. Nrf2' nin diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının patogeneğinde yer alabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir.

Amacımız, T2DM olan hastalarda Nrf2 geninin promotör bölgesindeki rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A), rs6721961 (T>G) polimorfizmleriyle diyabetin iki önemli mikrovasküler komplikasyonu olan DNP ve DAÜ arasındaki ilişkinin değerlendirilmesidir. Böylece, ilgili polimorfizmlerin diyabet komplikasyonlarına etkilerinin incelenmesi ve bu komplikasyonlar için yüksek riskli diyabetik hastaların belirlenmesine katkılarının olup olmayacağının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. Genel Bilgiler

2.1. Tip 2 Diyabetes Mellitus

2.1.1. Tanım ve epidemiyoloji

Diyabetes mellitus (DM), insülin üretim eksikliği ya da insülin etkisindeki bozukluklar nedeniyle karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmalarının bozulduğu kronik bir metabolik hastalıktır. T2DM ise insülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon bozukluğu ile karakterizedir ve en sık görülen diyabet tipidir, diyabetik olgularının %90' ını oluşturmaktadır (Saeedi et al., 2019; "Standards of Medical Care in Diabetes-2021," 2021; "Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu, 2020,").

Uluslararası Diyabet Federasyonu verilerine göre, 2021 yılında 20-79 yaş arasında 537 milyon insanda DM olduğu (bu yaş gurubundaki prevalansı %10,5) tahmin edilmektedir. Dünyada 2030 yılında aynı yaş grubunda 643 milyon insanda (DM prevalansı %11,3) ve 2045 yılında ise 783 milyon insanda diyabet görüleceği (DM prevalansı %12,2) tahmin edilmektedir (Saeedi et al., 2019). Türkiye Diyabet ve Epidemiyoloji Çalışması-2 2010 yılında 15 ilde yürütülmüş ve 26499 kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmada, ülkemizde 1998 yılından 2010 yılına kadar yaklaşık %90 bir artış ile DM prevalansının %16,5' e yükseldiği ve 2010 yılı itibari ile diyabetik hasta sayısının 6,5 milyona ulaştığı vurgulanmıştır (Satman et al., 2013).

DM tanısının konabilmesi için dört tanı kriterinden birinin olması gerekmektedir. Bunlar; 1. Açlık plazma glukozu ≥ 126 mg/dL olması, 2. Oral glukoz tolerans testinde 2. saat plazma glukozu ≥ 200 mg/dL olması, 3. Glikozillenmiş hemoglobin A1c (HbA1c) $\geq$ %6,5 olması, 4. Rastgele ölçülen plazma glukoz ≥ 200 mg/dL olması ve diyabet semptomlarının varlığıdır. Ancak hiperglisemi belirtileri yoksa, ilk üç kriterin doğrulanması gerekmektedir ("Standards of Medical Care in Diabetes-2021," 2021)

2.1.2 Mikrovasküler komplikasyonlar

Diyabetik hastalarda ortaya çıkan kronik hiperglisemi dokularda ve organlarda çeşitli mekanizmalarla uzun dönemli hasar ve işlev bozukluğuna neden olmaktadır. Vasküler komplikasyonlar morbidite ve mortalitenin en önemli nedenidir ve komplikasyonlar ikiye ayrılmaktadır: makrovasküler ve mikrovasküler

komplikasyonlar. Mikrovasküler komplikasyonlar, sinir, glomerül ve retinadaki kapiller damarların hasarlanması neden ile ortaya çıkmakta ve sırası ile diyabetik nöropati, nefropati ve retinopatiye neden olmaktadır. Makrovasküler komplikasyonlar, büyük damarlarda ortaya çıkan hasarlanma ve ateroskleroz nedeni ile gelişmekte ve klinik olarak kardiyovasküler hastalık, serebrovasküler ve periferik arter hastalığına neden olabilmektedir (Fowler, 2008).

2.1.2.1 Diyabetik nefropati

Diyabet, tüm dünyada kronik böbrek hastalığının (KBH) en önemli nedenidir. Diyabetin uzun vadeli komplikasyonlarından olan DNP ise son dönem böbrek hastalığı, hayat kalitesinde azalma ve artmış mortaliteye neden olabilmektedir (Fox et al., 2012; Khan et al., 2020; "Standards of Medical Care in Diabetes-2021," 2021; Wyld et al., 2021). T2DM olan hastaların yaklaşık yarısında, mikroalbuminüriden son dönem böbrek hastalığına kadar değişen derecelerde KBH gelişebilmektedir. T2DM olan hastaların %30-50' sinde albuminüri ve %20' sinde böbrek işlevlerinde bozulma olduğu tahmin edilmektedir ("IDF Diabetes Atlas 6th edn. <http://www.idf.org/diabetesatlas> (2013),").

Diyabete bağlı hiperglisemiden etkilenen başlıca hücreler endotel hücreleridir. Glomerüllerde yer alan podositler, mezengial ve tübül epitel hücreleri de hiperglisemiden etkilenmektedir (Herman-Edelstein et al., 2011; Magri & Fava, 2009; Susztak, Raff, Schiffer, & Böttinger, 2006). Sonuçta glomerül bazal membran kalınlaşması, glomerüloskleroz, fibrozis ve tübüler atrofi ortaya çıkmaktadır (Qian, Feldman, Pennathur, Kretzler, & Brosius, 2008; Wada et al., 2013).

DNP, klinik olarak idrar ile albumin atılımının artması (albuminüri), azalmış glomerüler filtrasyon hızı (GFH) veya her ikisinin varlığına dayanan bir klinik tanıdır. İdrar albumin atılımının 30 ile 300 mg/gr kreatinin veya mg/gün arasında olması mikroalbuminüri ve idrar albumin atılımının ≥ 300 mg/gr kreatinin veya mg/gün olması makroalbuminüri olarak tanımlanmaktadır ("Standards of medical care for patients with diabetes mellitus," 2003). Albuminüri, GFH kaybı, son dönem böbrek hastalığı ve kardiyovasküler olaylar için önemli bir risk faktörüdür (Adler et al., 2003; Nelson et al., 1991). DNP için diğer bir tanı kriteri düşük GFH olmasıdır. Böbrek işlevlerinin değerlendirilmesinde yaş, cinsiyet ve ırka göre düzeltilmiş tahmini GFH (tGFH) ölçümü güvenilir bir yöntemdir. tGFH' nin <60 mL/min/1,73

m²' nin altında olması DNP olarak tanımlanmaktadır. Bu hastalarda albüminüri olup olmaması önemli değildir. tGFH 60 mL/min/1,73 m²' nin üzerinde olan hastalarda eşlik eden albüminüri var ise DNP olarak tanımlanmaktadır ("Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu, 2020,"). Çalışmalarda, tGFH düşük olan diyabetik hastaların yaklaşık %40-50'sinde albüminüri saptanmamıştır (MacIsaac et al., 2004; Penno et al., 2011).

2.1.2.2 Diyabetik nöropati

Diyabetik sensörimotor periferik nöropati en sık görülen nöropatik sendromdur. Prevalansının %30 civarında olduğu gösterilmiştir (Ziegler, Papanas, Vinik, & Shaw, 2014). Duyu kaybını, ayak kaslarında güçsüzlük ve atrofi, reflekslerde bozulma gibi motor bozukluklar takip eder (R. Pop-Busui et al., 2017). Diyabetik ayak komplikasyonları için en önemli risk faktördür (Rastogi et al., 2020; Vadiveloo et al., 2018). Otonom nöropati, parasempatik ve sempatik otonom sinirleri etkilemekte ve özellikle kardiyovasküler, gastrointestinal ve ürogenital sistem tutulmaktadır. (Ioanid, Noica, & Pop, 1981; Maser, Mitchell, Vinik, & Freeman, 2003; Rodica Pop-Busui et al., 2010; Samsom et al., 2003).

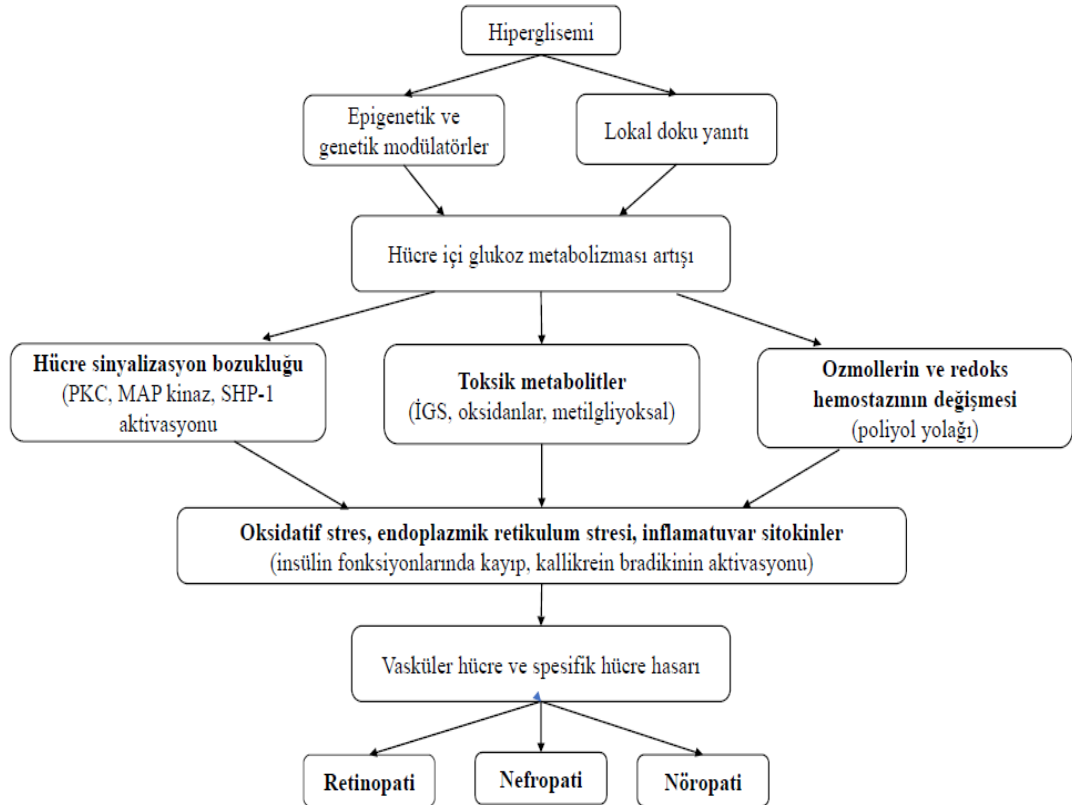
2.1.2.3 Diyabetik ayak ülserleri

Dünyada prevalansı yaklaşık %6 olup ülkelere göre sıklığı değişmektedir (P. Zhang et al., 2017). Diyabetik hastaların yaşam boyu toplam DAÜ riski %25 olarak saptanmıştır (Boulton et al., 2008). Bir ülser iyileştikten sonra tekrar ülser gelişme riski bir yıl içinde %40, beş yıl içinde ise %65 olasılıkla tekrarlayabilmektedir (D. G. Armstrong, Boulton, & Bus, 2017). İleri yaşlı, diyabet süresi uzun olan, sigara kullanan, hipertansiyonu (HT), nöropatisi olan hastalarda ise daha sıklıkla görülmektedir (D. G. Armstrong et al., 2017; Monteiro-Soares, Boyko, Ribeiro, Ribeiro, & Dinis-Ribeiro, 2012). Periferik nöropati duyusal, motor ve otonom sinir sistemini etkiler. Motor nöropati, ayağın kaslarında atrofiye neden olarak ayakta anatomik değişikliklere neden olmakta ve kemikler üzerindeki basınç dağılımı değişmektedir. Otonom nöropati de ciltte kuruluk, tırnaklarda değişim gibi yapısal farklılıklara neden olarak ülser oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca bu değişiklikler, ayağın daha kolay travma almasına yol açmaktadır. Duyusal nöropati

de travmaların farkedilmesini zorlaştırmaktadır (Bus et al., 2016; Monteiro-Soares et al., 2012).

2.1.3 Mikrovasküler hasarın moleküler mekanizmaları

Diyabetin komplikasyonlarının altında yatan en önemli neden kronik hiperglisemidir. Normal şartlarda hücre içine alınan glukoz, heksokinaz yolağı ile glukoz-6-fosfata dönüştürülerek glikoliz reaksiyonu ile metabolize edilmektedir. Hiperglisemi durumunda hücre içi glikozun fazlası heksokinaz yolağına yönlendirilemediği için alternatif yollara yönlendirilmektedir. Poliyol ve diaçil gliserol (DAG), protein kinaz C (PKC) yolağının aktivasyonu, oksidatif stres artışı, ileri glikozillenmiş son ürünlerin (İGS) oluşması, heksozamin yolağının aktivasyonu bu yolların bazılarıdır (Şekil 1). Bu mekanizmalar, bazı organlarda daha ön planda olsa da genellikle tüm damarsal yapılardaki mikrovasküler hasarlardan sorumludurlar (Barrett et al., 2017; Horie et al., 1997; Schmidt et al., 1995; Stitt et al., 1997).



Şekil 1. Mikrovasküler komplikasyonların patogenezinde hipergliseminin rolü (Barrett et al., 2017)

2.1.3.1 Diaçil gliserol/protein kinaz C aktivasyonu

Protein kinaz C (PKC), birçok hücrel fonksiyon ve sinyal iletim yolağında görevli serin/treonin ilişkili protein kinazdır ve vasküler işlevlerin çoğunda görev almaktadır. Hücre içi artan glikoliz ara ürünleri sonucu sentezlenen DAG ve serbest yağ asitleri PKC aktivasyonuna neden olmaktadır (Go, Sekiguchi, Nomura, Kikkawa, & Nishizuka, 1987; Xia et al., 1994). PKC aktivasyonu bazal membran kalınlaşmasına, ekstrasellüler matriks artışına, anormal anjiyogenez, apoptoz artışına neden olmaktadır (Brownlee, 2001; Geraldles et al., 2009; Koya et al., 2000; Koya et al., 1997).

2.1.3.2 Poliyol yolağı aktivasyonu

Poliyol yolu, glikozu fruktoza dönüştüren iki aşamalı bir süreçtir. İntraselüler glukoz aldoz redüktaz ile sorbitole çevrilmekte ve sorbitolden früktoz ortaya çıkmaktadır. Hiperglisemi durumlarında, glukoz bu yolağı yönlendirilmektedir. Dokularda poliyol yolağının aktive olmasının, sorbitolün neden olduğu ozmotik strese, sodyum-potasyum adenozin trifosfataz aktivitesinde azalmaya, oksidatif strese neden olarak hasara yol açtığı öne sürülmektedir (Chung, Ho, Lam, & Chung, 2003; Kubo, Urakami, Fatma, Akagi, & Singh, 2004; Tesfamariam et al., 1993; Toth et al., 2007).

2.1.3.3 İleri glikasyon son ürünleri

İGS, glukozla maruz kaldıkları için glike hale gelen proteinler veya lipitlerdir. Hipergliseminin hem hücre içi hem hücre dışı İGS oluşumunda primer neden olduğu gösterilmektedir (Degenhardt, Thorpe, & Baynes, 1998). İGS, intraselüler ve ekstrasellüler proteinlerinin yapısını değiştirerek matriks-matriks ve matriks-hücre arasındaki ilişkinin bozulması ile hedef hücre hasarına ve sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınımına, endotel hücrelerinden prokoagulan ve proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına neden olmaktadır (Brownlee, 2001; Haitoglou, Tsilibary, Brownlee, & Charonis, 1992; Kirstein, Aston, Hintz, & Vlassara, 1992; Schmidt et al., 1995; Skolnik et al., 1991; Tsilibary, Charonis, Reger, Wohlueter, & Furcht, 1988).

2.1.3.4 Oksidatif stres

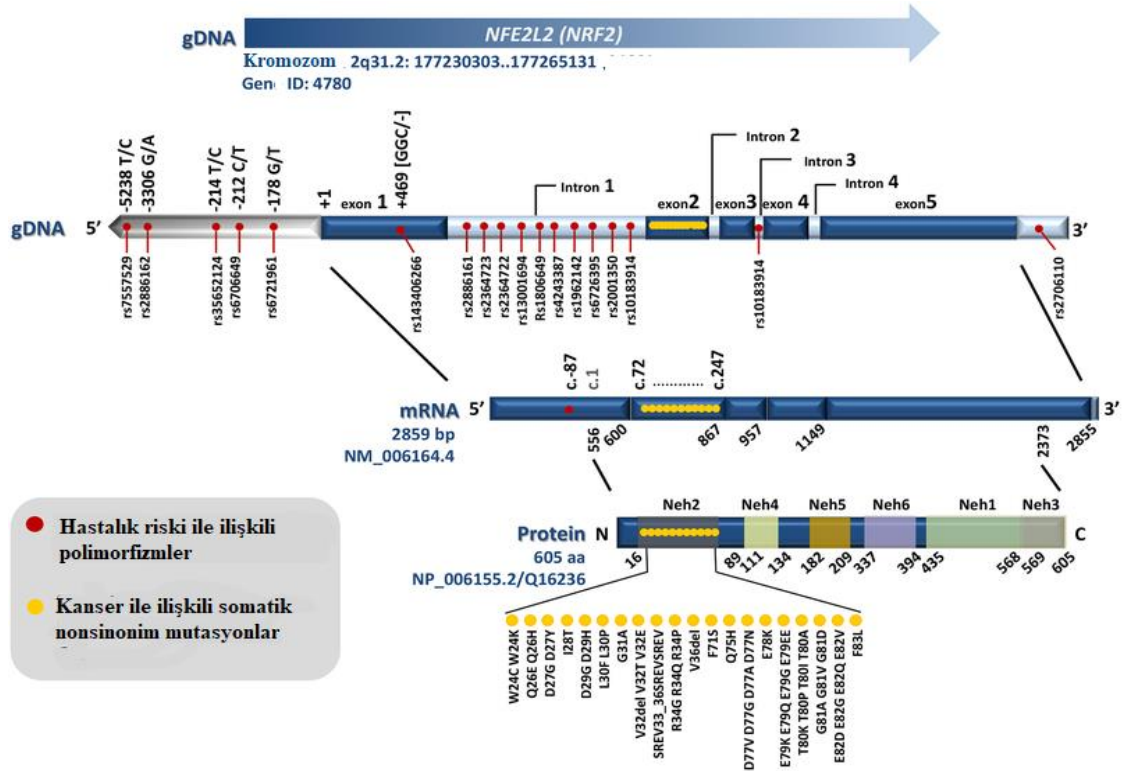
Mikrovasküler komplikasyonlara neden olan mekanizmaları birbirinden ayırmak mümkün değildir. Oksidatif stresin bu mekanizmalar ile iç içe geçtiği ve ana mekanizmalardan biri olduğu öne sürülmektedir (T. Nishikawa, Edelstein, & Brownlee, 2000).

Endotel hücrelerinde mitokondriyal reaktif oksijen ürünlerin seviyelerinin normal sınırlarda tutulması ile glukozun PKC aktivasyonu, İGS oluşumu, sorbitol birikimini aktive edemediği gösterilmektedir (T. Nishikawa, Edelstein, Du, et al., 2000; Takeshi Nishikawa et al., 2007). Altta yatan mekanizmalardan biri, mitokondriyal süperoksidin glikolitik yolağın enzimlerinden birini inhibe etmesi sonucu glukozun ve diğer ara ürünlerin glikolitik yoldan poliyol, heksozamin, PKC gibi yollara kaydırılması olabilir (Anupama, Rani, Shyni, & Raghu, 2018; Brownlee, 2001; Du et al., 2000). In vitro çalışmalarda da mitokondriyal superoksit dismutazın overekspresyonu sonucunda, glomerül, sinir ve endotel hücrelerinde hiperglisemiye bağlı değişikliklerin azaldığı gösterilmektedir (Craven, Phillips, Melhem, Liachenko, & DeRubertis, 2001; Goto et al., 2008; Vincent et al., 2007).

2.2 Keap1/Nrf2/ARE yolağı

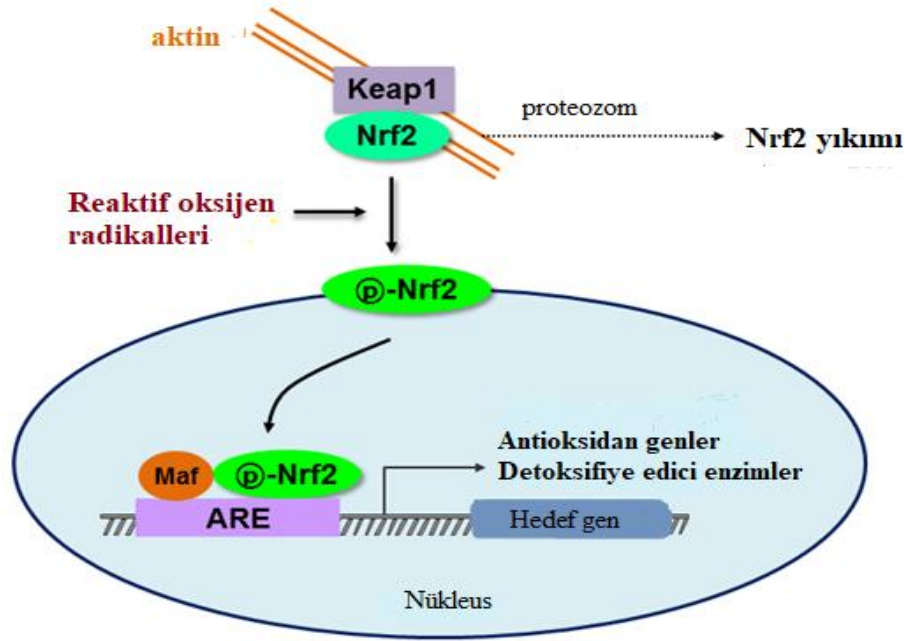
Keap1/Nrf2/ARE (Kelch-like ECH-associated protein 1/Nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2/ Antioksidan Response Element) yolağı, hücrel oksidatif hemostazın primer mediatörlerinden biridir. Bu yolak, detoksifikasyon enzimleri ve serbest radikal metabolizmasının, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarının tespit edilmesi, proteozom işlevlerinin regülasyonunda etkili olan 100' den fazla genin ekspresyonunu regüle ederek oksidatif stres ve hücre sağ kalımını düzenlemektedir (Alam et al., 1999; Itoh et al., 1997; McMahon et al., 2003).

Nrf2, ARE ilişkili gen ekspresyonunda rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (McMahon et al., 2003). CNC-bZIP (cap'n'collar family of basic leucine-zipper) transkripsiyon faktörlerinin bir üyesi olan Nrf2 geni, DNA bağlanma bölgesi, ARE bağlanma bölgesi ve transaktivasyon bölgesinden oluşan altı Nrf2-ECH homology (Neh) domaininden oluşmaktadır (Moi, Chan, Asunis, Cao, & Kan, 1994; Tong et al., 2006) (Şekil 2).



Şekil 2. İnsan Nrf2 geni, mRNA ve proteini (Cho, Marzec, & Kleeberger, 2015)

Nrf2, sitoplazmada Keap1 adlı baskılayıcı proteini ile inaktif bir kompleks halinde bulunmaktadır. Normal şartlarda Keap1, Nrf2' nin özel bağlanma bölgesine (Neh2) bağlanarak Nrf2 aktivitesini azaltmaktadır. Nrf2' nin sitoplazmada ubiquinizasyonunu sağlayarak proteozomlarda yıkılmasına yol açmakta ve böylece antioksidan yanıt ortaya çıkmamaktadır (McMahon et al., 2003; Tong et al., 2006). Reaktif oksijen radikalleri gibi uyaranlar Keap1' deki reaktif sistein rezidülerini modifiye eder ve Nrf2' nin Keap1' den ayrılmasına neden olarak Nrf2' nin proteozomlarda yıkılmasını engeller (D. D. Zhang et al., 2003). Serbest Nrf2, nükleusta ARE bölgesine bağlanarak oksidatif stres oluştuğunda antioksidan ve detoksifiye edici enzimlerin gen transkripsiyonlarını düzenlemektedir (Alam et al., 1999; Itoh et al., 1997; McMahon et al., 2003). Bu yolak, normal şartlarda Nrf-2' nin inhibe edilmesini ve oksidatif stres sırasında da antioksidan cevabın başlamasını sağlayarak koruyucu bir rol oynamaktadır (Şekil 3). Nrf2, otofaji, endoplazmik retikulum stresi, apoptoz gibi hücrel işlevleri etkileyen proteinlerinin ekspresyonunu da indüklemektedir (Lee et al., 2012; W. Li et al., 2014; Meakin et al., 2014; Sarcinelli et al., 2020)



Şekil 3. Keap1/Nrf2/ARE yolağı (Oh & Jun, 2017)

2.2.1 Keap1/Nrf2/ARE yolağı ve T2DM

Keap1/Nrf2/ARE yolağının diyabet ve komplikasyonlarının patogeneğinde yer alabileceğı belirtilmektedir. T2DM’ de hem pankreas disfonksiyonu hem de insülin direnci söz konusudur ve patogeneğinde oksidatif stres önemli bir rol oynamaktadır (Kajimoto & Kaneto, 2004; Liu et al., 2020). Hayvan çalışmalarında, Keap1/Nrf2/ARE yolağının pankreatik beta hücrelerinde koruyucu olduğu belirtilmektedir. Transjenik sıçanlarda Nrf2 indüksiyonunun reaktif oksijen radikallerini azaltmak suretiyle pankreas beta hücre hasarını da azalttığı gösterilmektedir (Urano et al., 2013). Her ne kadar yapılan çalışmaların sonuçları çelişkili de olsa, Nrf2'nin obezite ve insülin direncinde de rolü olabileceğı öne sürülmektedir (S. Li, Eguchi, Lau, & Ichii, 2020; Pi et al., 2010; Y. K. Zhang, Wu, Liu, & Klaassen, 2012). Öte yandan Nrf2’ nin aktive edilmesi ile insülin direncinin azaldığı gösterilmektedir (Yagishita et al., 2017).

2.2.1.1 Keap1/Nrf2/ARE yolağı ve diyabetik nefropati

Birçok çalışmada DNP patogeneğinde Keap1/Nrf2/ARE yolağının rolü olduğu gösterilmektedir. Nrf2 knockout sıçanlarda, DNP’ ye neden olan oksidatif stres belirteçlerinin ve fibrotik belirteçlerin arttığı, glomerüloskleroza dönüşmesi ve kreatinin klirensinin azaldığı ve albuminürinin arttığı belirtilmektedir (Jiang et al.,

2010; Yoh et al., 2008). Nrf2 indükleyici ajanlar uygulandığında DNP bulgularının gerilediği gözlenmektedir (Cui et al., 2012; Zheng et al., 2011). Bu ajanların, dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1)' in aktivitesini inhibe ettiği ve böbrekte oksidatif hasar, bazal membran kalınlaşması, albüminüri gibi DNP bulgularını azalttığı vurgulanmaktadır (Zheng et al., 2011). Klinik çalışmalar da bu yolağın DNP patogenezinde rolü olabileceğini göstermektedir. (de Zeeuw et al., 2013; Pergola et al., 2011).

2.2.1.2 Keap1/Nrf2/ARE yolağı ve diyabetik ayak ülserleri

DAÜ, diyabetik nöropati, ateroskleroz ve yara yeri iyileşmesindeki patolojiler sonucunda oluşan multifaktöriyel bir komplikasyondur. Oksidatif stres tüm bu faktörlerin gelişmesinde rol oynamaktadır. Doku rejenerasyon modelinde, hipergliseminin Keap1 disfonksiyonuna neden olarak Nrf2' nin nükleusa lokalizasyonunu engellediği ve uygun stres cevabının ortaya çıkmadığı gösterilmektedir (Soares et al., 2016). Diyabetik Nrf2 -/- sıçanlarda, yara yeri kapanma süresinin daha uzun olduğu ve bunun oksidatif DNA hasarı ve apoptoz artışına bağlı olduğu belirtilmektedir (Long et al., 2016). Yapılan çalışmalarla diyabetik sıçanlarda Nrf2' yi overeksprese eden eksozom tedavisinin yara iyileşmesinde rol oynadığı bildirilmektedir (X. Li et al., 2018).

2.2.1.3 Keap1/Nrf2/ARE yolağı ve diyabetik nöropati

Diyabetik nöropatinin patogenezinde oksidatif stres önemli bir rol üstlenmektedir. Siyatik sinir hücrelerindeki Nrf2 ekspresyonunun diyabetik sıçanlarda azaldığı bulunmaktadır (G. Negi, A. Kumar, & S. S. J. J. o. p. r. Sharma, 2011). Diyabetik sıçanlara Nrf2 aktivatörü verildiğinde ise nöropati bulgularının azaldığı gösterilmektedir (G. Negi, A. Kumar, & S. S. Sharma, 2011). Diğer yandan retinal gangliyonlarda Nrf2' nin koruyucu etkisi olduğu vurgulanmaktadır (Koriyama et al., 2010).

2.2.2 Nrf2 gen polimorfizmleri ile hastalıkların ilişkisi

Diyabetik hastalarda Nrf2' nin diyabet komplikasyonları ile ilişkili olduğunun gösterilmesiyle tek nükleotid polimorfizmlerinin, gen ekspresyonlarının işlev üzerindeki etkilerinin belirlenmesi Nrf2' nin araştırma konusu haline gelmesine

neden olmuştur. Ayrıca bu genin bazı polimorfizmlerinin astım, kardiyovasküler hastalıklar, malignitelerle ilişkili olduğu da belirtilmektedir (Cho et al., 2015; Figarska, Vonk, & Boezen, 2014; Okano et al., 2013; Shimoyama, Mitsuda, Hamajima, & Niwa, 2014; Ungvári et al., 2012). Hastalıklar ile ilişkili bulunan polimorfizmlerin daha çok non-ekzonik ve 5' flanking bölgelerinde ve intronlarda yer aldığı gösterilmektedir. Bu bulgular, bu bölgelerin Nrf2 ekspresyonunu etkilediğini düşündürmektedir (Cho et al., 2015). Örneğin Nrf2 intron1 bölgesindeki polimorfizmlerin azalmış genel ve kardiyovasküler mortaliteyle ilişkili olduğunu göstermektedir (Figarska et al., 2014).

Epidemiyolojik ve genetik çalışmalar incelendiğinde promotör bölgesindeki bazı polimorfizmlerin belirli hastalıklar ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Cho, 2013; Cho et al., 2015). En sık çalışılan polimorfizmler rs35652124, rs6706649, rs6721961' dir. Bu polimorfizmlerin, Nrf2' nin ARE bağlanma bölgesi gibi bölgelere bağlanmasını engellediği ve Nrf2' ye bağımlı gen transkripsiyonlarını azalttığı öne sürülmektedir (Marczak et al., 2012; Marzec et al., 2007). Nrf2 rs35652124 (T>C) polimorfizminin KB yüksekliği ile ilişkili olabileceği gösterilmektedir (Shimoyama, Mitsuda, Hamajima, et al., 2014). Hemodiyaliz hastalarında, rs35652124 (-653A/G) ve rs6721961 (-617C/A) polimorfizmlerinin yüksek KB ve artmış kardiyovasküler mortalite ilişkili olabileceği gösterilmektedir (Shimoyama, Mitsuda, Tsuruta, Hamajima, & Niwa, 2014). Promotör bölgesindeki -617 (C/A) polimorfizminin akut akciğer hasarı ve rs35652124 (A>G) polimorfizminin alkolik karaciğer hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (Marzec et al., 2007; Nunes Dos Santos et al., 2019).

3. Gereç ve Yöntem

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Nefroloji ve Endokrinoloji kliniklerine 01.01.2019-31.01.2022 arasında DNP ve DAÜ tanısı almış T2DM hastaları çalışma grubuna dahil edilmişlerdir. Kontrol grubu olarak DNP ve DAÜ olmayan T2DM hastaları dahil edilmiştir. T2DM ve DNP tanısı Amerikan Diyabet Cemiyeti kılavuzuna göre konulmuştur ("Standards of Medical Care in Diabetes-2021," 2021). DNP grubu, DNP sınıflamasına göre mikroalbuminüri, makroalbuminüri ve düşük tGFH olarak üç alt gruba ayrılmıştır (Tablo 1).

Çalışmaya dahil edilme kriterleri

1-T2DM öyküsü olması, DNP ve diyabetik ayak ülseri olması

2-18 yaşından büyük olması

3-Çalışmaya onam vermesi

Çalışmadan dışlama kriterleri

1-18 yaşından küçük olması

2-T2DM' ye bağlı olmayan bir böbrek hastalığı öyküsü olması

3-Gebe olması

Çalışmaya dahil edilen hastaların dahil edildikleri aşamada hastane kayıtlarında ve dosyalarında mevcut bulunan demografik ve klinik verileri ile laboratuvar sonuçları (açlık kan glukozu (AKG), üre, kreatinin, HbA1c, lipid profili (total kolesterol, trigliserid, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve albuminüri düzeyleri kaydedilmiştir. tGFH, CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) formülüne göre belirlenmiştir (Levey et al., 2009). Albuminüri düzeyinin belirlenmesinde, spot idrarda albumin/kreatinin oranı (mg/gr kreatinin) kullanılmıştır. Vücut kitle indeksi (VKİ, kg/m^2), vücut ağırlığının (kg), boyun (m) karesine bölünmesi ile hesaplanmıştır. Sistolik kan basıncı (SKB) ve diyastolik kan basıncı (DKB), hastalar 5 dakika dinlendikten sonra sfingomanometre aracılığıyla ölçülmüştür. Ortalama arter basıncı (OAB) $(\text{DKB} \times 2 + \text{SKB}) / 3$ formülü ile hesaplanmıştır. Çalışmamız için Ege Üniversitesi Etik Kurulu' ndan onay alınmıştır (Karar numarası 18-3/31).

Tablo 1. Kontrol grubunun ve DNP grubunu oluşturan mikroalbuminüri, makroalbuminüri ve düşük tGFH gruplarının tanımları

	Albüminüri	tGFH
Kontrol grubu	<30 mg/gr kreatinin	≥60 mL/min/1,73 m ²
DNP grubu		
Mikroalbuminüri	30-300 mg/gr kreatinin	≥60 mL/min/1,73 m ²
Makroalbuminüri	≥300 mg/gr kreatinin	≥60 mL/min/1,73 m ²
Azalmış tGFH	Değerlendirilmeye alınmamıştır.	<60 mL/min/1,73 m ²
tGFH, tahmini glomerüler filtrasyon hızı		

3.1 Laboratuvar çalışması

Olgulardan alınan kan örnekleri, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere alınmış ve daha sonra DNA izolasyonları yapılmıştır. Çalışmaya alınacak olgular tamamlanana kadar, DNA örnekleri -20 derecede saklanmıştır. DNA izolasyonu, DNA izolasyonu kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Konsantrasyonu ve saflığı uygun olan örnekler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çalışmasına kadar -20°C’de saklanmıştır. Nrf2 geninin promotör bölgesinde yer alan rs35652124 (T>C) ve rs6706649 (G>A) polimorfizmleri taq DNA polimeraz enzimi kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır (LightCycler RT-PCR Systems, Roche).

DNA izolasyonu

1. Örneğin hazırlanması

- 200 µL tam kan örneği, 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
- Kan örneği üzerine 20 µL proteinaz K eklenmiş ve pipet ile karıştırılmıştır.
- Karışım 60 °C’ de 5 dakika inkübe edilmiştir.

2. Hücre lizisi

- Karışım üzerine 200 µL Genomic Lysis/Binding Buffer eklenmiştir. Örnek, homojen bir çözelti elde etmek için vorteksenerek karıştırılmıştır.
- Karışım, otomatik çalkalama sistemi kullanılarak 5 dakika 60 °C’ 'de inkübe edilmiştir.

3. DNA bağlanması

- Örnek lizatına 200 µL etanol (%100) eklenmiştir. Pipet ile ve ardından vorteks ile karıştırılmıştır.
- GS kolonu, 2 mL toplama tüpü üzerine yerleştirilmiştir.
- Karışımın tümü GS kolonuna aktarılmıştır.
- GS kolonu, 1 dakika boyunca 14000xg'de santrifüj edilmiştir. Filtratı içeren toplama tüpü atılmış ve kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır.

4. Yıkama

- GS kolonuna 400 µL yıkama tamponu 1 eklenmiştir. 30 saniye boyunca 16000xg'de santrifüj yapılmıştır.
- Filtratı içeren toplama tüpü atılmış ve GS kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır.
- GS kolonuna 600 µL yıkama tamponu eklenmiştir.
- GS kolonu, 30 saniye boyunca 14000xg'de santrifüj edilmiştir.
- Filtratı içeren toplama tüpü atılmış ve GS kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır.
- Kolon matrisini kurutmak için 16000xg'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

5. Elüsyon

- GS kolonu 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- GS kolonu merkezine ısıtılmış olan elüsyon tamponundan 80 µL eklenmiştir.
- GS kolonu 30 saniye boyunca 16000xg'de santrifüj edilmiştir.
- GS kolonu uzaklaştırılmıştır.

DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıklarının belirlenmesi

Her örnekten 2 µl kullanılarak Nanodrop (ThermoFisher Scientific, USA) cihazında 260/280 nm ve 230/260 nm dalga boylarında absorbansları ölçülmüştür. Çalışmada, saflığı 1,8' in üzerinde olan örnekler kullanılmıştır.

DNA örneklerinin saklanması

Saflığı uygun olan örnekler PCR çalışmasına kadar -20°C'de saklanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR, DNA içerisinde yer alan özgün bir bölgenin oligonükleotid primerler ve taq polimeraz enzimi kullanılarak otomatik thermocycler sistem yardımı ile çoğaltılma esasına dayanan bir yöntemdir. Çoğaltılacak DNA, DNA polimeraz enzimi, nükleotidler ve DNA sentezinde öncülük edecek tek zincirli oligonükleotid primerler ile bir dizi termal döngüye tabi tutulmaktadır. Bu döngü üç aşamadan oluşmaktadır:

1. Denatürasyon: Çift sarmallı DNA kalıbının tek zincirli hale getirilmesi
2. Primerlerin bağlanması: Primerlerin tek zincirli DNA üzerinde kendilerine özgül olan diziye bağlanması
3. Zincirin uzaması: Bağlanmış primerlerin DNA polimeraz ile uzatılması

Bu üç aşamanın ard arda tekrarlanması ile, DNA dizisi üssel olarak artmaktadır. Bu üç aşama genellikle 20-40 kez tekrarlanmaktadır (Arya et al., 2005).

1. DNA örneğinin ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP) genotiplleme reaksiyon karışımının hazırlanması
 - Her genomik DNA örneği, IDTE, pH 7.5, ile 1.5-5 ng/μL konsantrasyona dilüe edilmiştir.
 - Mikrosentirfüj tüpünde, rhAmp Genotyping Master Mix ve rhAmp Reporter Mix 20:1 oranında birleştirilmiştir.
 - Yeni bir mikrosentirfüj tüpüne, Master mix ve Reporter mix karışımı, rhAmp SNP Assay ve nükleaz içermeyen su eklenerek SNP genotiplleme reaksiyon karışımı elde edilmiştir. Bileşenlerin miktarı ve toplam hacim Tablo 2' de belirtilmiştir.
 - SNP genotiplleme reaksiyon karışımı vortekslenip kısa santirfüj yapılmıştır.
 - PCR plakalarının kuyucuklarına SNP genotiplleme reaksiyon karışımı Tablo 2'de belirtilen miktarda konulmuştur.
 - Uygun kuyucuğa, çalışılacak DNA örneğinden 2 μL (Reaksiyon başına total DNA miktarı 3-10 ng olacak şekilde) eklenmiştir.
 - Negatif kontrol kuyucuklarına 2 μL nükleaz içermeyen su eklenmiştir.
 - Pozitif kontrol kuyucuklarına 2 μL kalıp DNA eklenmiştir.
 - Plakalar kapatılmış, kısa süreli vortekslenmiş ve santrifüj edilmiştir.

Tablo 2. Tek rhAmp tek nükleotid polimorfizmi genotipleme reaksiyonu karışımının bileşenleri (5 µL reaksiyon hacmi için)

Bileşen	Miktar
Master Mix ve Reporter mix karışımı	2,65 µL
rhAmp SNP Assay (20X)	0.25 µL
Nükleaz içermeyen su	0.10 µL
Kuyucuk başına hacim	3 µL

2. PCR çalışması

- Reaksiyon protokolü Tablo 3' e göre oluşturulmuştur.

Tablo 3. Tek nükleotid polimorfizmi genotipleme için termal döngü parametreleri

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika:saniye)	Döngü sayısı
Enzim aktivasyonu	95	10:00	1
Denaturasyon	95	00:10	40
Primerlerin bağlanması	60	00:30	
Primerlerin uzaması	68	00:20	
Sıcak inaktivasyon	99,9	15:00	1

Nrf2 geninin promotör bölgesinde yer alan bölgedeki rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A) ve rs6721961 (T>G) polimorfizmleri taq DNA polimeraz kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır (LightCycler RT-PCR Systems, Roche).

Nrf2 geninin rs35652124 (T>C) polimorfizmi için kullanılan primerler

- ileri: 5`-CACCTGAACGCCCTrCCTCT-3`
- geri: 5`-GCCGACCTGAGCTTAGGAGAATGrGAGAC-3` dir.

Nrf2 geninin rs6706649 G>A) polimorfizmi için kullanılan primerler

- ileri: 5`-GTGGGAGTTCAGAGGAGGrGCGTT-3`
- geri: 5`-GCGGCTAAAGATTTGGACCCAGArCCGTG -3` dir.

Nrf2 geninin rs6721961 (T>G) polimorfizmi için kullanılan primerler

- ileri: 5`-GGGAGATGTGGACAGCTrCCGGC
- geri: 5`-GCGGGCGTTCAGGGTGA rCTGCG-3` dir.

3.2 İstatiksel analiz

Kategorik değişkenler yüzdelik oran olarak verildi. Kategorik değişkenlerin gruplar arasındaki karşılaştırmaları Fisher exact ki-kare testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren tanımlayıcı değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma ve normal dağılım göstermeyen tanımlayıcı değişkenler medyan (25.-75. persentil) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olmayan tanımlayıcı değişkenler için Mann-Whitney U testi ve normal dağılıma sahip olan tanımlayıcı değişkenler için t-testi ve One-way ANOVA ile belirlendi. Değişkenler arasındaki ilişkinin belirlenmesi için lojistik regresyon analizi kullanıldı. $p<0,05$ istatistiksel anlamlılık için yeterli kabul edildi. İstatistiksel değerlendirme, Statistical Package of Social Science (SPSS) 14.0 programı ile yapıldı.

4. Bulgular

Çalışmamıza, DNP olan 110 hasta, DAÜ olan 60 hasta ve kontrol grubu olarak ise DNP ve DAÜ olmayan 90 hasta dahil edilmiştir.

4.1 Kontrol grubu ve DNP grubunun demografik, klinik ve laboratuvar bulgularının değerlendirilmesi

Kontrol grubu (n=90) ve DNP grubunun (n=110) demografik ve klinik özellikleri Tablo 4’ de gösterildi. Kontrol grubunun ortalama yaşı 58,2±9,0 iken, DNP grubunun 61,1±9,8 yıldı. DNP grubunun yaş ortalaması, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek bulundu (p=0,039). DM süresi, kontrol grubu ve DNP grubunda sırasıyla 10,0 (5,0-15,0) ve 13,5 (6,0-20,0) yıl idi ve DNP grubunun DM süresi kontrol grubundan istatistiksel olarak daha uzundu (p=0,042). Kontrol grubu ile DNP grubu kıyaslandığında, DNP grubunda HT’ si olan hasta sayısının daha fazla (p<0,001) olduğu, SKB’ nin daha yüksek (p=0,008) olduğu, DKB ve OAB açısından ise her iki grup arasında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi (sırasıyla p=0,897 ve p=0,247). VKİ kontrol grubunda 29,8±5,4 kg/m² iken DNP grubunda 31,6±5,4 olarak bulundu ve DNP grubunun VKİ’ nin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü (p=0,030).

Tablo 4. Kontrol grubu ve DNP grubunun demografik ve klinik özellikleri

	Kontrol grubu (n=90)	DNP grubu (n=110)	p
Yaş (yıl)	58,2±9,0	61,1±9,8	0,039
Erkek cinsiyet (n, %)	43 (%47,8)	47 (%42,7)	0,475
DM süresi (yıl)	10,0 (5,0-15,0)	13,5 (6,0-20,0)	0,042
HT (n, %)	48 (%53,3)	86 (%78,2)	<0,001
SKB (mmHg)	132 (125-141)	140 (128-156)	0,008
DKB (mmHg)	81 (74-90)	80 (72-90)	0,897
OAB (mmHg)	98 (91-105)	100 (93-110)	0,247
VKİ (kg/m ²)	29,8±5,4	31,6±5,4	0,030
DM, diyabetes mellitus; DKB, diyastolik kan basıncı; HT, hipertansiyon; OAB, ortalama arteriyel basınç; SKB, sistolik kan basıncı; VKİ, vücut kitle indeksi			

Tablo 5’ de ise kontrol grubu ve DNP grubunun laboratuvar bulguları gösterildi. Bu bulgulara göre kontrol grubu ve DNP grubunda AKG sırasıyla 134 (108-170) mg/dL ve 138 (107-173) mg/dL iken HbA1c düzeyi %7,1 (6,3-8,3) ve %7,6 (6,6-8,6) olduğu ve her iki grup arasında AKG ve HbA1c açısından anlamlı farkın olmadığı saptandı (sırasıyla p=0,623 ve p=0,245). Serum kreatinin düzeyi ve tGFH’ nin, kontrol grubunda sırası ile 0,77 (0,69-0,84) mg/dL ve 94 (84-102) mL/dak/1,73 m² iken DNP grubunda sırası ile 0,95 (0,74-1,37) mg/dL ve 72 (46-96) mL/dak/1,73 m² olduğu belirlendi. Bu iki grup kıyaslandığında DNP grubunda serum kreatinin düzeyinin daha yüksek (p<0,001) ve tGFH’ nin ise daha düşük olduğu görüldü (p<0,001). Kontrol grubu ve DNP grubu; total kolesterol, trigliserid, LDL ve HDL kolesterol düzeyleri açısından irdelendiğinde, bu değerlerin benzer düzeylerde olduğu belirlendi (sırasıyla p=0,217, p=0,171, p=0,134 ve p=0,122). Albüminüri düzeyi kontrol grubu ve DNP grubunda sırası ile 8 (5-13) ve 86 (38-446) mg/gr kreatinin olduğu ve DNP grubundaki albüminüri düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (p<0,001).

Tablo 5. Kontrol grubu ve DNP grubunun laboratuvar bulguları

	Kontrol grubu (n=90)	DNP grubu (n=110)	p
AKG (mg/dL)	134 (108-170)	138 (107-173)	0,623
HbA1c (%)	7,1 (6,3-8,3)	7,6 (6,6-8,6)	0,245
Üre (mg/dL)	28 (23-33)	37 (27-52)	<0,001
Kreatinin (mg/dL)	0,77 (0,69-0,84)	0,95 (0,74-1,37)	<0,001
tGFH (mL/dak/1,73 m ²)	94 (84-102)	72 (46-96)	<0,001
Total kolesterol (mg/dL)	193±46	184±44	0,217
Trigliserid (mg/dL)	140 (98-194)	152 (113-216)	0,171
LDL (mg/dL)	107 (86-139)	98 (79-122)	0,134
HDL (mg/dL)	48 (40-55)	45 (37-53)	0,122
Albüminüri (mg/gr kreatinin)	8 (5-13)	86 (38-446)	<0,001
AKG, açlık kan glukozu; HDL, yüksek yoğunluklu lipoprotein; LDL, düşük yoğunluklu lipoprotein; tGFH, tahmini glomerüler filtrasyon hızı			

DNP olan olgular, mikroalbüminüri, makroalbüminüri ve düşük tGFH grubu olarak üç gruba ayrıldı ve demografik ve klinik özellikleri Tablo 6' da gösterildi. Bu üç grup incelendiğinde, mikroalbüminüri grubundaki hasta sayısının 41, makroalbüminüri grubundaki hasta sayısının 21 ve düşük tGFH grubundaki hasta sayısının 48 olduğu belirlendi. Bu üç grubun yaşları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu belirlendi ($p<0,001$). Düşük tGFH grubundaki hastaların, mikroalbüminüri ve makroalbüminüri grubundaki hastalardan (sırasıyla $p=0,010$ ve $p<0,001$), mikroalbüminüri grubundaki hastaların ise makroalbüminüri grubundaki hastalardan daha yaşlı olduğu ($p<0,001$) belirlendi. Hastaların DM süresi ve HT sıklığı göz önünde bulundurulduğunda, DM süresinin ve HT sıklığının benzer olduğu (sırasıyla $p=0,102$ ve $p=0,053$) ancak bu üç grup SKB, DKB ve OAB açısından incelendiğinde ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın bulunduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,016$, $p=0,001$ ve $p<0,001$). SKB' nin makroalbüminüri grubunda mikroalbüminüri grubundan daha yüksek ($p=0,003$) ve düşük tGFH grubu ile benzer olduğu ($p=0,052$) gösterildi. Düşük tGFH ve mikroalbüminüri grubunda SKB açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,239$). DKB makroalbüminüri grubunda, mikroalbüminüri grubu ve düşük tGFH grubu ile kıyaslandığında daha yüksek bulundu (sırasıyla $p<0,001$ ve $p=0,002$). Mikroalbüminüri grubu ile düşük GFH grubunun DKB değerleri benzerdi ($p=0,706$). OAB değerlerinin ise makroalbüminüri grubunda mikroalbüminüri grubundan ve düşük tGFH grubundan daha yüksek bulundu (sırasıyla $p<0,001$ ve $p=0,002$) ancak mikroalbüminüri grubu ve düşük tGFH grubunda OAB açısından anlamlı bir fark saptanmadı saptandı ($p=0,365$). Her üç grup VKİ açısından incelendiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmedi ($p=0,726$).

Tablo 6. DNP grubunu oluşturan mikroalbüminüri, makroalbüminüri ve düşük tGFH gruplarının demografik ve klinik özellikleri

	Mikro- albüminüri (n=41)	Makro- albüminüri (n=21)	Düşük tGFH (n=48)	p	p [#]	p [*]	p [§]
Yaş (yıl)	60,7±9,4	50,6±7,2	65,9±7,2	<0,001	<0,001	0,010	<0,001
Erkek (n, %)	17 (%41,5)	7 (%33,3)	23 (%47,9)	0,519	-	-	-
DM süresi (yıl)	11,5 (5,0-20,0)	12,0 (4,0-14,0)	15,0 (10-20,5)	0,102	-	-	-
HT (n, %)	31 (%76)	13 (%61)	40 (%88)	0,053	-	-	-
SKB (mmHg)	130 (121-154)	151 (135-171)	140 (127-156)	0,016	0,003	0,239	0,052
DKB (mmHg)	80 (70-85)	90 (84-105)	80 (70-90)	0,001	<0,001	0,706	0,002
OAB (mmHg)	97 (90-104)	110 (105-125)	99 (92-107)	<0,001	<0,001	0,365	0,002
VKİ (kg/m ²)	31,6±5,5	32,4±5,1	31,2±5,5	0,726	-	-	-
DM, diyabetes mellitus; DKB, diyastolik kan basıncı; HT, hipertansiyon; OAB, ortalama arteriyel basınç; SKB, sistolik kan basıncı; VKİ, vücut kitle indeksi #Mikroalbüminüri vs makroalbüminüri, * Mikroalbüminüri vs düşük tGFH, §Makroalbüminüri vs düşük tGFH							

Mikroalbüminüri, makroalbüminüri ve düşük tGFH grubunun laboratuvar bulguları Tablo 7' de gösterildi. Bu üç grupta AKG ve HbA1c değerlerinin benzer olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,133$ ve $p=0,359$). Serum kreatinin düzeyi ve tGFH' nin gruplar arasındaki değerlerine baktığımızda, mikroalbüminüri grubunda sırasıyla 0,78 (0,66-0,89) mg/dL ve 91 (77-100) mL/dak/1,73 m², makroalbüminüri grubunda sırasıyla 0,71 (0,59-0,83) mg/dL ve 103 (86-111) mL/dak/1,73 m² ve düşük tGFH grubunda sırasıyla 1,48 (1,16-1,89) mg/dL ve 44 (35-54) mL/dak/1,73 m² olduğu görüldü. Düşük tGFH grubunun serum kreatinin düzeyi hem mikroalbüminüri hem de makroalbüminüri grubundan daha yüksek iken (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p < 0,001$), tGFH ise diğer iki gruptan daha düşük olarak belirlendi (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p < 0,001$). Mikroalbüminüri ve makroalbüminüri grubunun kreatinin düzeyleri benzer ($p=0,198$) iken makroalbüminüri grubunun tGFH değeri daha yüksek ($p=0,018$) olarak belirlendi. Düşük tGFH grubu ile makroalbüminüri grubu total kolesterol ve trigliserid düzeyleri açısından incelendiğinde, makroalbüminüri grubunun değerlerinin daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,003$ ve $p=0,016$). Her üç grup arasında LDL ve HDL kolesterol düzeyleri açısından anlamlı farklılık belirlenemedi (sırasıyla $p=0,245$ ve $p=0,698$). Mikroalbüminüri, makroalbüminüri ve düşük tGFH grubunun albüminüri düzeyi sırasıyla, 68 (50-122), 607 (487-1199) ve 51 (18-604) mg/gr kreatinin olarak saptandı. Makroalbüminüri grubunun albüminüri düzeyi hem mikroalbüminüri grubu hem de düşük tGFH grubundan daha yüksek olarak bulundu (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p < 0,001$). Mikroalbüminüri grubu ile düşük tGFH grubunun albüminüri düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,545$).

Tablo 7. DNP grubunu oluşturan mikroalbüminüri, makroalbüminüri ve düşük tGFH gruplarının laboratuvar bulguları

	Mikro- albüminüri (n=41)	Makro- albüminüri (n=21)	Düşük tGFH (n=48)	p	p [#]	p [*]	p [§]
AKG (mg/dL)	142 (107-181)	151 (111-219)	129 (109-153)	0,133	-	-	-
HbA1c (%)	7,2 (6,4-8,1)	7,5 (6,4-9,9)	7,7 (6,6-9,0)	0,359	-	-	-
Üre (mg/dL)	31 (23-39)	26 (22-35)	52 (39-78)	<0,001	0,202	<0,001	<0,001
Kreatinin (mg/dL)	0,78 (0,66-0,89)	0,71 (0,59-0,83)	1,48 (1,16-1,89)	<0,001	0,198	<0,001	<0,001
tGFH (mL/dak/1,73 m ²)	91 (77-100)	103 (86-111)	44 (35-54)	<0,001	0,018	<0,001	<0,001
Total kolesterol (mg/dL)	186±39	210±59	172±35	0,004	0,097	0,254	0,003
Trigliserid (mg/dL)	154 (114-212)	199 (131-270)	141 (96-177)	0,042	0,192	0,136	0,016
LDL (mg/dL)	96 (78-130)	113 (86-122)	92 (73-119)	0,245	-	-	-
HDL (mg/dL)	45 (37-53)	43 (38-53)	46 (37-55)	0,698	-	-	-
Albüminüri (mg/gr kreatinin)	68 (50-122)	607 (487-1199)	51 (18-604)	<0,001	<0,001	0,545	<0,001
AKG, açlık kan glukozu; HDL, yüksek yoğunluklu lipoprotein; LDL, düşük yoğunluklu lipoprotein; tGFH, tahmini glomerüler filtrasyon hızı #Mikroalbüminüri vs makroalbüminüri, *Mikroalbüminüri vs düşük tGFH, §Makroalbüminüri vs düşük tGFH							

Kontrol grubunu oluşturan 90 hastadan altı hastanın rs35652124 (T>C) ile üç hastanın rs6706649 (G>A) polimorfizmlerinin belirlenmesi için iki kez PCR yöntemi ile çalışılmasına rağmen genotiplendirilemedi. DNP grubunda (n=110) ise rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A) ve rs6721961 (T>G) polimorfizmlerinin belirlenmesi için iki kez PCR çalışılmasına rağmen sırasıyla dokuz, üç ve dokuz hastada elde edilemedi.

Bu nedenle, kontrol grubunda rs35652124 (T>C) polimorfizmi için 84 hasta, rs6706649 (G>A) polimorfizmi için 87 hasta ve rs6721961 (T>G) polimorfizmi için 90 hasta çalışıldı. DNP grubunda ise rs35652124 (T>C) polimorfizmi için 101 hasta, rs6706649 (G>A) polimorfizmi için 107 hasta ve rs6721961 (T>G) polimorfizmi için 101 hasta çalışıldı.

Kontrol grubundaki hastaların (n=84) rs35652124 (T>C) polimorfizmi açısından TT, TC ve CC genotip dağılımları sırasıyla %33,3, %33,3 ve %33,3 olarak saptandı (Tablo 8). DNP olan hastaların (n=101) TT, TC ve CC genotip dağılımları ise sırasıyla %45,5, %30,7 ve %23,8 olarak belirlendi. DNP olan hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, rs35652124 (T>C) polimorfizmi açısından genotip dağılımlarında bir farklılık gözlenmedi (p=0,192). Wild-type olan TT genotipi ile karşılaştırıldığında, TC ve CC genotipinin DNP riskini arttırmadığı gösterildi (sırasıyla p=0,265 ve p=0,076).

Tablo 8. Kontrol grubu ve DNP grubunda Nrf2 rs35652124 (T>C) polimorfizminin genotip dağılımı

	Kontrol grubu (n=84)	DNP grubu (n=101)	p
TT genotipi	28 (%33,3)	46 (%45,5)	0,192
TC genotipi	28 (%33,3)	31 (%30,7)	
CC genotipi	28 (%33,3)	24 (%23,8)	
TT: wild-type, TC: Heterozigot, CC: Homozigot Kontrol grubuna ait 6 hastada, DNP grubuna ait 9 hastada genotiplendirme yapılamamıştır.			

Kontrol grubundaki 87 hasta rs6706649 (G>A) polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde GG, GA ve AA genotip dağılımları sırasıyla %78,2, %8,0 ve %13,8 olarak saptandı (Tablo 9). DNP grubundaki 107 hastanın ise GG, GA ve AA genotip dağılımları sırasıyla %69,2, %20,6 ve %10,2 olarak belirlendi. Kontrol grubu ile DNP grubunun bu polimorfizmlerinin genotip dağılımları kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak bir farklılığın olduğu gözlemlendi (p=0,048). Wild-type olan GG genotipi GA genotipi ile kıyaslandığında GA genotipi DNP riskini arttırabiliyorken (Exp(B)=2,888, %95 Güven aralığı 0,160-7,189, p=0,023), AA genotipi ile kıyaslandığında ise AA genotipinin bir farklılık yaratmadığı gösterildi (p=0,703).

Tablo 9. Kontrol grubu ve DNP grubunda Nrf2 rs6706649 (G>A) polimorfizminin genotip dağılımı

	Kontrol grubu (n=87)	DNP grubu (n=107)	p
GG genotipi	68 (%78,2)	74 (%69,2)	0,048
GA genotipi	7 (%8,0)	22 (%20,6)	
AA genotipi	12 (%13,8)	11 (%10,2)	
GA: wild-type, GA: Heterozigot, AA: Homozigot Kontrol grubuna ait 3 hastada, DNP grubuna ait 3 hastada genotiplendirme yapılamamıştır.			

Kontrol grubundaki hastaların (n=90) rs6721961 (T>G) polimorfizmi açısından TT, TG ve GG genotip dağılımları sırasıyla %1,1, %4,4 ve %94,5 olarak saptandı (Tablo 10). DNP olan hastaların (n=101) TT, TG ve GG genotip dağılımları ise %2,0, %13,9 ve %84,1 olarak saptandı. DNP olan hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, rs6721961 (T>G) polimorfizmi açısından genotip dağılımlarında bir farklılık saptanmadı (p=0,072) ve DNP açısından risk faktörü olabileceği belirlenmedi (TG genotipi için p=0,678 ve GG genotipi için p=0,574).

Tablo 10. Kontrol grubu ve DNP grubunda Nrf2 s6721961 (T>G) polimorfizminin genotip dağılımı

	Kontrol grubu (n=90)	DNP grubu (n=101)	p
TT genotipi	1 (%1,1)	2 (%2,0)	0,072
TG genotipi	4 (%4,4)	14 (%13,9)	
GG genotipi	85 (%94,5)	85 (%84,1)	
TT: wild-type, TG: Heterozigot, GG: Homozigot DNP grubuna ait 9 hastada genotiplendirme yapılamamıştır.			

4.2 Kontrol grubu ve DAÜ grubunun demografik, klinik ve laboratuvar bulgularının değerlendirilmesi

Kontrol grubu (n=90) ve DAÜ (n=60) grubunun demografik ve klinik özellikleri Tablo 11’de gösterildi. DAÜ grubundaki hastaların ortalama yaşı $62,1 \pm 9,3$ yıl iken kontrol grubunun $58,2 \pm 9,0$ yılı ($p=0,013$). DAÜ grubundaki hastaların %83,3’ ü ve kontrol grubundaki hastaların %47,8’ i erkekti ($p<0,001$). DM süresine bakıldığında DAÜ grubunun DM süresinin kontrol grubundan daha uzun olduğu görüldü (sırasıyla $15,0$ ($7,5-21,0$) yıl ve $10,0$ ($5,0-15,0$) yıl, $p=0,006$). Kontrol grubu ile DAÜ grubundaki HT sıklığının benzer ($p=0,104$) olduğu ve aynı zamanda SKB, DKB ve OAB açısından da aralarında anlamlı bir farklılığın olmadığı (sırasıyla $p=0,441$, $p=0,183$, $p=0,858$) belirlendi. VKİ, kontrol grubunda $29,8 \pm 5,4$ kg/m^2 ve DAÜ grubunda $27,8 \pm 4,3$ kg/m^2 idi. DAÜ grubundaki hastalar VKİ bakımından kontrol grubundaki hastalarla kıyaslandığında, bu hastalarda VKİ değerleri anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi ($p=0,018$).

Tablo 11. Kontrol grubu ve DAÜ grubunun demografik ve klinik özellikleri

	Kontrol grubu (n=90)	DAÜ grubu (n=60)	p
Yaş (yıl)	$58,2 \pm 9,0$	$62,1 \pm 9,3$	0,013
Erkek cinsiyet (n, %)	43 (%47,8)	50 (%83,3)	<0,001
DM süresi (yıl)	$10,0$ ($5,0-15,0$)	$15,0$ ($7,5-21,0$)	0,006
HT (n, %)	48 (%53,3)	40 (%66,7)	0,104
SKB (mmHg)	132 (125-141)	135 (120-155)	0,441
DKB (mmHg)	81 (74-90)	75 (70-85)	0,183
OAB (mmHg)	98 (91-105)	97 (90-111)	0,858
VKİ (kg/m^2)	$29,8 \pm 5,4$	$27,8 \pm 4,3$	0,018
DM, diyabetes mellitus; DKB, diyastolik kan basıncı; HT, hipertansiyon; OAB, ortalama arteriyel basınç; SKB, sistolik kan basıncı; VKİ, vücut kitle indeksi			

Kontrol grubu (n=90) ve DAÜ (n=60) grubunun laboratuvar bulguları Tablo 12’ de gösterildi. Kontrol grubunda AKG 134 (108-170) mg/dL iken DAÜ grubunda 142 (102-185) mg/dL idi ve her iki grup arasında fark bulunamadı (p=0,722). Kontrol grubunda HbA1c düzeyi %7,1 (6,3-8,3) iken DAÜ grubunda %8,5 (6,8-10,2) idi. Kontrol grubu hastaları ile karşılaştırıldığında, DAÜ olan hastaların HbA1c düzeyi daha yüksek bulundu (p=0,003). Serum kreatinin ve tGFH kontrol grubunda sırası ile 0,77 (0,69-0,84) mg/dL ve 94 (84-102) mL/dak/1,73 m² iken DAÜ grubunda sırası ile 0,93 (0,76-1,10) mg/dL ve 84 (66-100) mL/dak/1,73 m² idi. DAÜ grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kreatinin düzeylerinin DAÜ hastalarında anlamlı olarak yüksek (p<0,001) ve tGFH’ nin ise anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi (p=0,001). DAÜ ile kontrol grubu total kolesterol, LDL ve HDL düzeyleri bakımından kıyaslandığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu belirlendi ve bu değerlerin DAÜ grubunda daha düşük (sırasıyla p<0,001, p=0,019, p<0,001) ve trigliserid düzeyinin ise benzer olduğu görüldü (p=0,415). DAÜ hastalarının albüminüri düzeyleri ise kontrol grubundan daha yüksek saptandı (p<0,001).

Tablo 12. Kontrol grubu ve DAÜ grubunun laboratuvar bulguları

	Kontrol grubu (n=90)	DAÜ grubu (n=60)	p
AKG (mg/dL)	134 (108-170)	142 (102-185)	0,722
HbA1c (%)	7,1 (6,3-8,3)	8,5 (6,8-10,2)	0,003
Üre (mg/dL)	28 (23-33)	37 (27-48)	<0,001
Kreatinin (mg/dL)	0,77 (0,69-0,84)	0,93 (0,76-1,10)	<0,001
tGFH (mL/dak/1,73 m ²)	94 (84-102)	84 (66-100)	0,001
Total kolesterol (mg/dL)	193±46	152±42	<0,001
Trigliserid (mg/dL)	140 (98-194)	127 (100-159)	0,415
LDL (mg/dL)	107 (86-139)	90 (66-116)	0,019
HDL (mg/dL)	48 (40-55)	32 (24-38)	<0,001
Albüminüri (mg/gr kreatinin)	8 (5-13)	52 (16-254)	<0,001
AKG, açlık kan glukozu; HDL, yüksek yoğunluklu lipoprotein; LDL, düşük yoğunluklu lipoprotein; tGFH, tahmini glomerüler filtrasyon hızı			

Polimorfizmlerin belirlenmesi için yapılan analizlerde, DAÜ grubundaki dört hastanın rs35652124 (T>C), beş hastanın rs6706649 (G>A) ve yedi hastanın rs6721961 (T>G) genotiplendirmeleri iki kez PCR ile çalışılmasına rağmen sonuç vermedi. Bu nedenle, DAÜ grubunda rs35652124 (T>C) polimorfizmi için 56 hasta, rs6706649 (G>A) polimorfizmi için 55 hasta ve rs6721961 (T>G) polimorfizmi için 53 hasta çalışıldı. Kontrol grubunda rs35652124 (T>C) polimorfizmi için 84 hasta, rs6706649 (G>A) polimorfizmi için 87 hasta ve rs6721961 (T>G) polimorfizmi için 90 hasta çalışıldı.

DAÜ olan hasta grubunda (n=56) rs35652124 (T>C) polimorfizmi için genotip dağılımının %44,6 TT, %37,5 TC ve %17,9 CC olduğu saptandı ve genotip dağılımı %33,3 olarak saptanan kontrol grubu ile kıyaslandığında benzer olduğu gözlemlendi (p=0.118) (Tablo 13) ve DAÜ gelişimi üzerine bir risk faktörü olamayacağı bulundu (CC genotipi için p=0,066 ve TC genotipi için p=0,662)

Tablo 13. Kontrol grubu ve DAÜ grubunda Nrf2 rs35652124 (T>C) polimorfizminin genotip dağılımı

	Kontrol grubu (n=84)	DAÜ grubu (n=56)	p
TT genotipi	28 (%33,3)	25 (%44,6)	0,118
TC genotipi	28 (%33,3)	21 (%37,5)	
CC genotipi	28 (%33,3)	10 (%17,9)	
TT: wild-type, TC: Heterozigot, CC: Homozigot Kontrol grubuna ait 6 hastada, DAÜ grubuna ait 4 hastada genotiplendirme yapılamamıştır.			

DAÜ grubu (n=55) rs6706649 (G>A) polimorfizmi için değerlendirildiğinde hastaların %80,0' ının GG, %10,9' unun GA ve %9,1' inin AA genotipinde olduğu ve kontrol grubunda ise bu genotip oranlarının sırasıyla %78,2, %8,0 ve 13,8 olduğu ve sonuçların benzer olduğu belirlendi (p=0,625) (Tablo 14). Wild-type olan GG genotipi GA ve AA genotipleri ile kıyaslandığında, bu polimorfizmlerin DAÜ gelişimi üzerinde bir etkisi olamayacağı belirlendi (sırasıyla p=0,633 ve p=0,437).

Tablo 14. Kontrol grubu ve DAÜ grubunda Nrf2 rs6706649 (G>A) polimorfizminin genotip dağılımı

	Kontrol grubu (n=87)	DAÜ grubu (n=55)	p
GG genotipi	68 (%78,2)	44 (%80,0)	0,625
GA genotipi	7 (%8,0)	6 (%10,9)	
AA genotipi	12 (%13,8)	5 (%9,1)	
GA: wild-type, GA: Heterozigot, AA: Homozigot Kontrol grubuna ait 3 hastada, DAÜ grubuna ait 5 genotiplendirme yapılamamıştır.			

Aynı şekilde DAÜ olan hastaların (n=53) rs6721961 (T>G) polimorfizmi için genotip dağılımlarına bakıldığında, TT, TG ve GG genotipleri sırasıyla %5,7, %7,5 ve %86,8 olduğu ve kontrol grubunda ise bu dağılımların sırasıyla %1,1, %4,4 ve %94,5 olduğu ve aralarında anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi (p=0.196) (Tablo 15). Bu polimorfizmin DAÜ gelişimi üzerine bir risk faktörü olamayacağı bulundu (TG genotipi için p=0,417 ve GG genotipi için p=0,143).

Tablo 15. Kontrol grubu ve DAÜ grubunda Nrf2 s6721961 (T>G) polimorfizminin genotip dağılımı

	Kontrol grubu (n=90)	DAÜ grubu [#] (n=53)	p
TT genotipi	1 (%1,1)	3 (%5,7)	0,196
TG genotipi	4 (%4,4)	4 (%7,5)	
GG genotipi	85 (%94,5)	46 (%86,8)	
TT: wild-type, TG: Heterozigot, GG: Homozigot DAÜ grubuna ait 7 hastada genotiplendirme yapılamamıştır.			

5. Tartışma

Çalışmamızda, T2DM olan hastalarda diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından olan DNP ve DAÜ ile Nrf2 geninin promotör bölgesindeki rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A) ve rs6721961 (T>G) polimorfizmleri ile olan ilişkisi araştırıldı.

Çalışmamızın demografik ve klinik bulgularını kısaca özetleyecek olursak; DNP olan hastaların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha ileri yaşta olduğu ve DM sürelerinin daha uzun olduğu ancak AKG ve HbA1c düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılığın olmadığı bulundu. DNP grubunun kreatinin ve albüminüri düzeyi daha yüksek, tGFH' si daha düşük bulundu. DAÜ olan hastaları da kontrol grubundaki hastalarla kıyasladığımızda ise DAÜ hastalarının daha yaşlı ve DM sürelerinin daha uzun olduğu belirlendi. Bu hasta grupları incelendiğinde, DAÜ grubu hastalarında kreatinin ve albüminüri düzeylerinin daha yüksek ve tGFH' lerinin ise daha düşük olduğu gözlemlendi. AKG açısından kıyaslandığında da aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken, HbA1c düzeyinin DAÜ grubunda daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızın polimorfizm sonuçlarını kısaca özetleyecek olursak; DNP olan grubu ve kontrol grubunun rs6706649 (G>A) genotip dağılımlarının oranları kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı. Bu oranlara göre GA genotipinin DNP riskini arttırabileceği gösterildi. rs35652124 (T>C) ve rs6721961 (T>G) polimorfizmlerinin genotip dağılımları irdelendiğinde DNP olan grup ile kontrol grubu arasında benzerliğin olduğu ve bu iki polimorfizmin DNP için risk faktörü olamayacağı sonucuna varıldı. DAÜ olan hastalar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, rs35652124 (T>C) ve rs6706649 (G>A) ve rs6721961 (T>G) genotip dağılımları benzer bulundu ve bu polimorfizmler risk faktörü olarak bulunmadı.

DNP, T2DM olan hastalarda mikrovasküler komplikasyonlardan biridir. Son dönem böbrek yetmezliğine en sık neden olan hastalıktır. Hastaların hayat kalitesini etkilemekte, morbidite ve mortalitesini arttırmaktadır (Fox et al., 2012; Wyld et al., 2021). Ayrıca bu hastalarda yaş diğer bir risk faktördür (Afkarian et al., 2013; Al-Rubeaan et al., 2014; Unnikrishnan et al., 2007). Bir çalışmada, DNP' si olmayan hastaların yaşı 59,4±12,7 yıl ve DNP' si olan hastaların yaşı 63,9±12,0 olarak bulunmuş, DNP evresi ilerledikçe hasta yaşının arttığı gösterilmiştir (Al-Rubeaan et

al., 2014). Hindistan’da yapılan ve yaklaşık 1700 hastanın dahil edildiği bir çalışmada da DNP olan hastaların DNP olmayanlara göre daha yaşlı olduğu ve DNP evresi arttıkça hasta yaşının arttığı saptanmıştır (Unnikrishnan et al., 2007). Bu çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda, DNP olan hastaların kontrol grubundaki hastalara kıyasla daha ileri yaşta olduğu saptandı. Ayrıca düşük tGFH’ si olan grubun mikroalbuminüri ve makroalbuminüri grubundaki hastalardan daha yaşlı olduğu görüldü. Makroalbuminürisi olan hastalar mikroalbuminürisi olan hastalardan daha gençti. Bu sonucun hasta sayımızın az olmasına bağlı olduğunu düşündük.

DM süresinin uzun olması da DNP için bir risk faktörüdür (Al-Rubeaan et al., 2014; Tapp et al., 2004; Unnikrishnan et al., 2007). Yapılan çalışmalarda, DNP’ si olan hastaların DM sürelerinin DNP’ si olmayan hastalardan daha uzun olduğu saptanmış ve DNP evresi erken olan hastalarla karşılaştırıldığında DNP evresi ileri olan hastaların DM sürelerinin daha uzun olduğu gösterilmiştir (Al-Rubeaan et al., 2014; Tapp et al., 2004; Unnikrishnan et al., 2007). Çalışmamızda da DNP grubunun DM süresinin kontrol grubuna göre daha uzun olduğu, düşük tGFH grubunun DM süresinin mikroalbuminüri ve makroalbuminüri grubundan daha uzun olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı belirlendi. Bunun nedeninin hasta grubundaki sayının değerlendirme yapılması için yeterli olmamasına bağlı olabileceği düşünüldü. DNP için en önemli risk faktörlerinden biri de HT’ dir ve önceki çalışmalarda DNP olan hastalarda KB kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (Al-Rubeaan et al., 2014; Eroglu et al., 2008; Unnikrishnan et al., 2007). Çalışmamızda HT sıklığı kontrol grubunda %53,3 iken DNP grubunda %78,2 idi ve SKB, DNP grubunda daha yüksek bulundu. Literatürle uyumlu olarak, makroalbuminürisi olan hastaların SKB’ lerinin mikroalbuminürisi olan gruptan daha yüksek olduğu gözlemlendi. Fakat makroalbuminürisi olan hastaların SKB’ leri düşük tGFH olan hastalarinkinden yüksekti ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. DKB açısından yapılan değerlendirmede makroalbuminüri grubunun DKB’ leri düşük tGFH grubundan yüksekti. Bu bulgunun nedeni düşük tGFH grubundaki hastaların KB’ lerinin medikal tedavi ile daha sıkı kontrol altında tutuluyor olması olabilir.

Büyük ölçekli toplum çalışmalarında, DNP’ si olan hastaların AKG, HbA1c ve kolesterol düzeylerinin DNP’ si olmayan diyabetik hastalardan daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Al-Rubeaan et al., 2014; Bruno et al., 1996; Tapp et al., 2004). Bu çalışmaların tersine, bizim çalışmamızda DNP olan hastaların AKG ve HbA1c

düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı değildi. Çalışmaya dahil edilen DNP' li hastalar ve kontrol grubu hastaları düzenli olarak takip edilen ve tedavisi düzenlenen hastalar olduğu için, kan şekeri regülasyonu daha iyi olan bir hasta grubunu temsil ediyor olabilir. Kolesterol düzeyleri de bu nedenle kontrol grubu ile farklı saptanmamış olabilir. Hasta sayısının az olması da bu bulgunun diğer bir nedeni olabilir.

T2DM' nin diğer önemli mikrovasküler komplikasyonu DAÜ' dir. DAÜ alt ekstremitte amputasyonlarına neden olarak yaşam kalitesini azaltmakta, hastaların başka kişilere bağımlı olarak yaşamasına neden olmakta, hastaneye yatışları arttırmakta ve sonuç olarak hastaların morbidite ve mortalitesini arttırmaktadır (David G. Armstrong et al., 2020; Hicks et al., 2016; Khunkaew, Fernandez, & Sim, 2019; Martins-Mendes et al., 2014; Robbins et al., 2008; Toygar, Hancerlioglu, Yildirim-Simsir, & Cetinkalp, 2020). Hastaların yaşı ve DM süreleri arttıkça DAÜ riskinin arttığı iyi bilinmektedir (Banik et al., 2020; Perrin et al., 2019; Tapp et al., 2003). Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak DAÜ olan hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DAÜ olan hastalarının daha ileri yaşta olduğu ve DM sürelerinin daha uzun olduğu belirlendi. Önceki çalışmalarda erkek hastaların %56-67 oranında olduğu gösterilmiştir (Haji Zaine et al., 2014; Perrin et al., 2019; Uysal et al., 2017). Ülkemizde de yapılan bir çalışmada DAÜ olan hastaların benzer şekilde (%58,3 oranında) erkek olduğu gösterilmiştir (Dogan, Onar, Aydin, & Gumustas, 2019). Bizim çalışmamızda 60 DAÜ olan hasta grubunda 50' sinin erkek olduğu ve oranın %83,3 olduğu belirlendi. Literatürdeki bulgulara göre erkek hasta sayısı daha fazlaydı.

Yapılan çalışmalarda, AKG ve HbA1c düzeylerinin DAÜ olan hastalarda daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Pastore et al., 2022; Yazdanpanah et al., 2018). Pastore ve ark.' nın yaptıkları çalışmada, DAÜ olan hastaların ortalama HbA1c düzeyi %9,7 ve AKG 247,5 mg/dL iken DAÜ olmayan hastaların ortalama HbA1c düzeyi %7,8 ve AKG 184,7 mg/dL olarak saptanmıştır (Pastore et al., 2022). Yazdanpanah ve ark. da benzer olarak DAÜ olan hastalarda HbA1c düzeyinin yüksek olduğunu göstermişlerdir (Yazdanpanah et al., 2018). Bizim çalışmamızda da bu araştırmacıların sonuçlarına benzer şekilde DAÜ olan hastaların HbA1c düzeyleri daha yüksek bulundu ancak AKG düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. AKG düzeylerinde farklılığın gözlenmemesinin nedeninin, DAÜ olan hastaların tanısı

konulduktan sonra kan şekeri regülasyonlarının sağlanması sonucu AKG düzeylerinin kontrol grubu ile benzer bulunması olabilir. Diyabetik hastalarda son üç aylık kan şekeri düzeylerini yansıtan HbA1c değerlerini irdelemek daha doğru bir yaklaşımdır. Bizim hasta grubumuzda da HbA1c düzeyinin daha yüksek olması, DAÜ olan hastaların hiperglisemik olduğunu ve kan şekeri regülasyonlarının kötü olduğunu düşündürdü. Çalışmamızda ayrıca, DAÜ grubun total kolesterol, LDL ve HDL kolesterol düzeyleri kontrol grubundan daha düşük saptandı. Bu bulgunun nedeni de hastaların ek hastalıkları nedeni ile daha sıkı lipid kontrolü için antihiperlipidemik tedavi alıyor olmaları olabilir. Diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının temelinde hiperglisemi olması nedeni ile DAÜ' ye nöropati, retinopati, nefropati gibi diğer komplikasyonlar eşlik edebilmektedir (Pastore et al., 2022). Pastore ve ark. nın çalışmasında, DAÜ olan hastaların kontrol grubuna göre kreatinin düzeyleri daha yüksek saptanmıştır (sırasıyla 1.4 ± 0.4 mg/dl ve 1.2 ± 0.5 mg/dl; $p=0.002$) (Pastore et al., 2022). Bizim çalışmamızda da önceki çalışmalar ile uyumlu olarak DAÜ olan hastaların kreatinin ve albüminüri düzeyleri yüksek bulundu.

T2DM' nin mikrovasküler komplikasyonlarının patogenezinde oksidatif stresin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir ve hiperglisemi oksidatif stresi arttırmaktadır. Oksidatif stres de diğer yollarla birlikte en çok vasküler endotel hücrelerini etkilemekte ve DNP, DAÜ gibi mikrovasküler komplikasyonların ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır (Craven et al., 2001; Du et al., 2000; Goto et al., 2008; T. Nishikawa, Edelstein, & Brownlee, 2000; T. Nishikawa, Edelstein, Du, et al., 2000). Nrf2, oksidatif stres sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen radikallerine yanıt olarak ARE ilişkili genlerin transkripsiyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörü olup hücrelerin oksidatif hasardan korunmasında görevli olan yollardan biridir. Normal şartlarda, sitoplazmada Keap1' e bağlı halde bulunması nükleusa geçmesini engellemekte ve proteozomlarda yıkılmasını sağlamaktadır. Oksidatif stres sırasında ise, Nrf2 Keap1' den ayrılarak nükleusa geçip ARE' ye bağlanarak, antioksidan ve detoksifiye edici enzimleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu sağlayarak antioksidan cevabın oluşmasına katkıda bulunmaktadır (McMahon et al., 2003; Tong et al., 2006). Bu transkripsiyon faktörünün birçok organ sisteminde önemli rolü olduğu belirtilmektedir (Marzec et al., 2007; Okano et al., 2013; Song et al., 2016; Ungvári et al., 2012; von Otter et al., 2010). Deneysel çalışmalar Nrf2' nin DNP,

DAÜ gibi diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarında rolü olabileceğini göstermekte ve bazı klinik çalışmalar da bu bulguları desteklemektedir (Hong et al., 2012; Jiang et al., 2010; Kalvala et al., 2020; Long et al., 2016; Pergola et al., 2011; Wang et al., 2021; Zheng et al., 2011).

Bazı araştırmalarda Nrf2 polimorfizmlerinin vitiligo, ülseratif kolit gibi otoimmün hastalıklar, Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar, maligniteler ve genel ve kardiyovasküler mortalite ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Arisawa, Tahara, Shibata, Nagasaka, Nakamura, Kamiya, Fujita, Yoshioka, Okubo, Hirata, et al., 2008; Arisawa, Tahara, Shibata, Nagasaka, Nakamura, Kamiya, Fujita, Yoshioka, Okubo, Sakata, et al., 2008; Okano et al., 2013; Shimoyama, Mitsuda, Hamajima, et al., 2014; Shimoyama, Mitsuda, Tsuruta, et al., 2014; Song et al., 2016; Ungvári et al., 2012; von Otter et al., 2010). Nrf2' nin promotör bölgesinde en çok çalışılan polimorfizmler rs35652124, rs6706649 ve rs6721961 polimorfizmleridir. Promotör bölgesindeki polimorfizmler gen ekspresyonlarını regüle edebilmektedir (Umapathy, Krishnamoorthy, Mariappanadar, Viswanathan, & Ramkumar, 2018). Çalışmalarda, promotör bölgesindeki polimorfizmlerin Nrf2' nin ARE' ye bağlanmasını ve dolayısıyla Nrf2' nin transkripsiyonel aktivitesini azalttığı öne sürülmektedir (Marczak et al., 2012; Marzec et al., 2007). Bu bulgularla uyumlu olarak Nrf2 geninin promotör bölgesindeki rs35652124, rs6706649 ve rs6721961 gibi polimorfizmlerinin otoimmünite, inflamasyon ve oksidatif hasar ile karakterize olan hastalıklarla ilişkili bulunması diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarında da rolü olabileceğini düşündürmektedir. Deneysel ve klinik çalışmalarda, diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarında Nrf2' nin rolü olduğu gösterilmiştir (Hong et al., 2012; Kalvala et al., 2020; Long et al., 2016; Pergola et al., 2011; Soares et al., 2016; Zheng et al., 2011). Ve bu yüzden son yıllarda diyabet ve Nrf2 polimorfizmleri arasındaki ilişkinin ortaya konma çalışmalarına ağırlık verilmeye başlanmıştır. Fakat, mikrovasküler komplikasyonlar ile Nrf2 polimorfizmlerinin ilişkisini inceleyen çalışma sayısı çok azdır.

Xu ve ark., periferik nöropati, nefropati, retinopati, ayak ülserleri ve mikroanjyopati gibi diyabet komplikasyonları olan 214 diyabetik hasta, komplikasyonu olmayan 236 diyabetik hasta ve 359 sağlıklı insandan oluşan kontrol grubunda Nrf2' nin altı farklı polimorfizminin (rs2364723, rs13001694, rs10497511, rs1806649, rs1962142 ve rs6726395) dağılımını incelemişlerdir. Sağlıklı kontrol grubu ile T2DM olan grup

arasında bu polimorfizmlerin genotip dağılımları benzer iken komplikasyonu olan ve olmayan T2DM hastaları arasında rs2364723, rs10497511, rs1962142 ve rs6726395 polimorfizmlerinin genotipik dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark saptamışlardır. Sonuç olarak, bazı polimorfizmlerin komplikasyonu olan diyabetik hastalarda daha sık görüldüğü bulunmuştur (Xu et al., 2016).

Çalışmamızda, Nrf2 geninin promotör bölgesindeki rs35652124 (T>C) polimorfizmi ile DNP ilişkisi değerlendirildiğinde bu hastalar ile kontrol grubu arasında genotip dağılımı benzer bulundu. rs35652124 (T>C) polimorfizminin DNP için risk faktörü olamayacağı sonucuna varıldı ancak CC genotipi değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç vermemesine rağmen DNP gelişiminde düşük olasılıkla da olsa etken olabileceği düşünüldü ($p=0,076$). Daha kesin bilgi elde edilebilmesi için hasta sayısının artırılmasının doğru olacağı sonucuna varıldı. Literatürde DNP ile rs35652124 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi değerlendiren başka bir çalışmanın bulunmaması, sonuçlarımızın tam olarak değerlendirilmesi açısından yön gösterici olmamıştır.

Nrf2 promotör bölgesi polimorfizmlerinden en çok çalışılanlarından biri de rs6706649'dur. Promotör bölgesindeki rs6706649 (-651 G/A) polimorfizminin Nrf2'nin ARE'ye bağlanmasını ve transkripsiyonel aktivitesini azalttığı öne sürülmektedir. Böylece, promotör bölgesindeki rs6706649 polimorfizminin hücrelerdeki antioksidan kapasitenin azalmasına neden olması beklenmektedir. (Boettler et al., 2012; Zazueta, Jimenez-Urbe, Pedraza-Chaverri, & Buelna-Chontal, 2022). Çalışmamızda, DNP grubu ile kontrol grubunun rs6706649 genotip dağılımı karşılaştırıldığında farklı bulundu ve GA genotipinin DNP riskini arttırabileceği gösterildi. Literatürde bu polimorfizmin DNP ile ilişkisini değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Bu sonuçlara göre rs6706649 polimorfizminin, Nrf2'nin transkripsiyonel aktivitesini azaltarak antioksidan kapasitenin azalması yoluyla diyabet komplikasyonlarına yatkınlık yaratıyor olabilir yorumu yapıldı.

2021 yılında yayınlanan bir çalışmada, DNP'si olmayan 500 hasta ile DNP'si olan 383 hastada rs6721961 (-617C/A) polimorfizmi araştırılmıştır. DNP'si olmayan hastalarda, CC, CA ve AA genotip dağılımları, sırasıyla %44,4 %46,2 ve %9,4 iken DNP'si olan hastalarda ise CC, CA ve AA genotip dağılımları, sırasıyla %42,0, %53,0 ve %5,0 olarak bulunmuştur. Genotip dağılımı DNP olan ve olmayan hastalarda istatistiksel olarak farklı saptanmıştır ($p=0,018$). AA genotipindeki

hastalarda DNP riskinin daha düşük olduğu gösterilmiştir (OR 0,52, 95% Güven aralığı 0,28-0,94, p=0,029) (Wang et al., 2021). Nrf2 rs6721961 polimorfizminin Nrf2 aktivitesini arttırması ve dolayısıyla antioksidan kapasitenin artmasının T2DM' nin komplikasyonlarını önleyebileceği öne sürülebilir. Çalışmamızda ise rs6721961 (T>G) polimorfizmi genotip dağılımı incelendiğinde kontrol grubunun %94,5' inin, DNP grubunun %84,1' inin ve DAÜ grubunun %86,8' inin GG genotipine sahip olduğu bulundu. DNP ve DAÜ grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında genotip dağılımlarında fark olmadığı gösterildi. Çalışma grubumuzdaki hastalar arasında GG genotipinin bu kadar yaygın olmasının nedeninin, toplumumuzun genetik havuzunun farklı olması olabileceği gibi hasta sayısının az olması yorumu yapıldı.

Diyabetik hastalarda, hiperglisemi ve oksidatif stres reaktif oksijen ürünlerinin oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Reaktif oksijen ürünleri, endotel hücre hasarı, vasküler hasar ve yara iyileşmesinde gecikmeye neden olarak DAÜ gelişimine katkıda bulunabilmektedir. Nrf2' nin DAÜ gelişiminde rolü olabileceği çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (X. Li et al., 2018; Long et al., 2016). Nrf2 polimorfizmleri ile DAÜ ilişkisini inceleyen çalışma sayısı oldukça azdır.

Çalışmamızda, Nrf2 geninin promotör bölgesindeki rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A), rs6721961(T>G) polimorfizmlerinin genotip dağılımlarının DAÜ olan hastalar ile DAÜ olmayan kontrol grubu arasında benzer olduğu saptandı. rs6706649 (G>A) ve rs6721961 (T>G) polimorfizminin genotip oranları kıyaslandığında DAÜ riskini etkilemediği gözlemlendi. rs35652124 polimorfizminde TT genotipi CC ve TC genotipleri ile kıyaslandığında, CC genotipi dağılımlarının TT genotip dağılımlarından daha düşük olduğu ancak TC genotipinin DAÜ oluşumunda etkisinin olamayacağı sonucuna varıldı. Bir çalışmada, T2DM olan 150 hasta, DAÜ olan 100 hasta ve 150 sağlıklı kontrol grubu incelenmiştir. rs35652124 TT genotipinin DAÜ riskini arttırdığı, redoks hemostazı ve yara iyileşmesinde anahtar genlerin regülasyonunu bozduğu öne sürülmüştür (R. Teena, Dhamodharan, Ali, Rajesh, & Ramkumar, 2020). Bazı çalışmalarda da rs35652124 polimorfizmlerinin Nrf2' nin ARE' ye bağlanmasını azaltarak transkripsiyonel aktivitesini azaltabileceği öne sürülmüştür (Marzec et al., 2007; Song et al., 2016).

Son yıllarda Teena ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada, Nrf2' nin posttranslasyonel modifikasyon bölgesinde yer alan rs182428269 (-127 C/T) polimorfizmi ile DAÜ arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu bölge, Nrf2' nin Keap1' e

bağlandığı bölgede yer aldığı için bu polimorfizmin Nrf2-Keap1 ilişkisini bozacağı ve Nrf2' nin Keap1' den ayrılamadığı için aktivitesinin engelleneceği ve ekspresyonunun azalacağı öne sürülmüş ve TT genotipi sıklığının DAÜ olan hastalarda sağlıklı kontrol grubundan daha yüksek olduğu ve DAÜ riskini arttırdığı gösterilmiştir. Ek olarak, TT genotipindeki hastalarda periferik kan mononükleer hücrelerindeki Nrf2 ekspresyonunun daha az olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada yazarlar, posttranslasyonel modifikasyon bölgesinde yer alan rs182428269 polimorfizminin Nrf2' nin Keap1' den ayrılmasını engellediği ve böylece Nrf2' nin daha fazla proteazomal yıkıma maruz kalarak antioksidan etkisini gösteremediğini öne sürmüşlerdir (Rajan Teena et al., 2021).

Çalışmamızda, DAÜ ile Nrf2 polimorfizmleri irdelendiğinde arasında herhangi anlamlı bir ilişki saptanmadı. Bunun nedeni, ilgili polimorfizmlerin DAÜ gelişiminde etkilerinin olmaması olabilir. Diğer nedenlerden biri ise çalışmamıza dahil ettiğimiz DAÜ olan hasta sayısının azlığı olabilir. Ayrıca, altta yatan nedenlerden birinin toplumumuzda bu polimorfizmlerin sıklığının diğer toplumlardan farklı olması olabileceği düşünüldü.

Literatür taramaları sonrasında Nrf2 polimorfizmleri ile DNP ve DAÜ ilişkisini araştıran çalışma sayısı oldukça sınırlı olduğundan çalışmamızın bu alanda yapılan çalışmalara öncü olabilecek nitelikte olduğu düşünüldü.

6. Sonuç ve Öneriler

Oksidatif stres diyabet komplikasyonlarının patogeneğinde etkin bir rol oynamaktadır. Nrf2 geni, önemli bir transkripsiyon faktörü olup oksidatif strese yanıt olarak antioksidan genlerin ekspresyonunu regüle ederek hücreleri oksidatif stresten korumaktadır. Nrf2 nin promotör bölgesindeki polimorfizmlerinin Nrf2'nin ARE'ye bağlanmasını olumlu veya olumsuz yönde etkileyerek oksidan-antioksidan hemostazını etkilediği düşünülmektedir. Çalışma sayısı kısıtlı olmakla birlikte, çalışmalarda diyabetin komplikasyonları için bazı polimorfizmlerinin koruyucu bazı polimorfizmlerinin ise risk faktörü olabileceği gösterilmektedir. Çalışmamızda hedefimiz, Nrf2 rs35652124 (T>C), rs6706649 (G>A), rs6721961 (T>G) polimorfizmlerinin DNP ve DAÜ komplikasyonları ile ilişkili olup olmadığını ve bu polimorfizmlerin diyabet komplikasyonları riski yüksek hastaların erken tanısında kullanılıp kullanılamayacağını araştırmaktır. Çalışılan polimorfizmlerden rs6706649 GA genotipinin DNP için risk faktörü olduğu belirlendi. Bu sonuçtan yola çıkarak hasta sayısının arttırılarak bulgumuzun pekiştirilmesiyle diyabetik hastalarda DNP ve DAÜ için tanısal genetik bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşündük. Sonuç olarak bulgularımız, Nrf2' nin promotör bölgesindeki bazı polimorfizmlerin diyabet komplikasyonları ile ilişkili olabileceğini gösterdi. Bulgularımız doğrultusunda, daha büyük popülasyonlarda, farklı hasta gruplarında, diyabetin diğer komplikasyonları ile Nrf2 polimorfizmlerinin, oksidan-antioksidan sistemin serumdaki düzeylerinin ve dokudaki oksidatif stres belirteçlerinin ilişkisinin araştırılmasının yararlı olacağı düşünüldü.

Kaynaklar

- Adler, A. I., Stevens, R. J., Manley, S. E., Bilous, R. W., Cull, C. A., & Holman, R. R. (2003). Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int*, 63(1), 225-232. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00712.x
- Afkarian, M., Sachs, M. C., Kestenbaum, B., Hirsch, I. B., Tuttle, K. R., Himmelfarb, J., & de Boer, I. H. (2013). Kidney disease and increased mortality risk in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 24(2), 302-308. doi:10.1681/asn.2012070718
- Al-Rubeaan, K., Youssef, A. M., Subhani, S. N., Ahmad, N. A., Al-Sharqawi, A. H., Al-Mutlaq, H. M., . . . AlNaqeb, D. (2014). Diabetic nephropathy and its risk factors in a society with a type 2 diabetes epidemic: a Saudi National Diabetes Registry-based study. *PLoS One*, 9(2), e88956. doi:10.1371/journal.pone.0088956
- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A. M., & Cook, J. L. J. J. o. B. C. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. 274(37), 26071-26078.
- Anupama, N., Rani, M. P., Shyni, G., & Raghu, K. J. T. i. V. (2018). Glucotoxicity results in apoptosis in H9c2 cells via alteration in redox homeostasis linked mitochondrial dynamics and polyol pathway and possible reversal with cinnamic acid. 53, 178-192.
- Arisawa, T., Tahara, T., Shibata, T., Nagasaka, M., Nakamura, M., Kamiya, Y., . . . Nakano, H. (2008). Nrf2 gene promoter polymorphism and gastric carcinogenesis. *Hepatogastroenterology*, 55(82-83), 750-754.
- Arisawa, T., Tahara, T., Shibata, T., Nagasaka, M., Nakamura, M., Kamiya, Y., . . . Nakano, H. (2008). Nrf2 gene promoter polymorphism is associated with ulcerative colitis in a Japanese population. *Hepatogastroenterology*, 55(82-83), 394-397.
- Armstrong, D. G., Boulton, A. J. M., & Bus, S. A. (2017). Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. *N Engl J Med*, 376(24), 2367-2375. doi:10.1056/NEJMra1615439
- Armstrong, D. G., Swerdlow, M. A., Armstrong, A. A., Conte, M. S., Padula, W. V., & Bus, S. A. (2020). Five year mortality and direct costs of care for people with diabetic foot complications are comparable to cancer. *Journal of Foot and Ankle Research*, 13(1), 16. doi:10.1186/s13047-020-00383-2
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. J. E. r. o. m. d. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. 5(2), 209-219.

- Banik, P. C., Barua, L., Moniruzzaman, M., Mondal, R., Zaman, F., & Ali, L. (2020). Risk of diabetic foot ulcer and its associated factors among Bangladeshi subjects: a multicentric cross-sectional study. *BMJ Open*, 10(2), e034058. doi:10.1136/bmjopen-2019-034058
- Barrett, E. J., Liu, Z., Khamaisi, M., King, G. L., Klein, R., Klein, B. E. K., . . . Casellini, C. M. (2017). Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement. *J Clin Endocrinol Metab*, 102(12), 4343-4410. doi:10.1210/jc.2017-01922
- Boettler, U., Volz, N., Teller, N., Haupt, L. M., Bakuradze, T., Eisenbrand, G., . . . Marko, D. (2012). Induction of antioxidative Nrf2 gene transcription by coffee in humans: depending on genotype? *Mol Biol Rep*, 39(6), 7155-7162. doi:10.1007/s11033-012-1547-6
- Boulton, A. J., Armstrong, D. G., Albert, S. F., Frykberg, R. G., Hellman, R., Kirkman, M. S., . . . Wukich, D. K. (2008). Comprehensive foot examination and risk assessment. A report of the Task Force of the Foot Care Interest Group of the American Diabetes Association, with endorsement by the American Association of Clinical Endocrinologists. *Phys Ther*, 88(11), 1436-1443. doi:10.1093/ptj/88.11.1436
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813-820. doi:10.1038/414813a
- Bruno, G., Cavallo-Perin, P., Bargero, G., Borra, M., Calvi, V., D'Errico, N., . . . Pagano, G. (1996). Prevalence and risk factors for micro- and macroalbuminuria in an Italian population-based cohort of NIDDM subjects. *Diabetes Care*, 19(1), 43-47. doi:10.2337/diacare.19.1.43
- Bus, S. A., van Deursen, R. W., Armstrong, D. G., Lewis, J. E., Caravaggi, C. F., & Cavanagh, P. R. (2016). Footwear and offloading interventions to prevent and heal foot ulcers and reduce plantar pressure in patients with diabetes: a systematic review. *Diabetes Metab Res Rev*, 32 Suppl 1, 99-118. doi:10.1002/dmrr.2702
- Cho, H. Y. (2013). Genomic structure and variation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 286524. doi:10.1155/2013/286524
- Cho, H. Y., Marzec, J., & Kleeberger, S. R. (2015). Functional polymorphisms in Nrf2: implications for human disease. *Free Radic Biol Med*, 88(Pt B), 362-372. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.012
- Chung, S. S., Ho, E. C., Lam, K. S., & Chung, S. K. (2003). Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol*, 14(8 Suppl 3), S233-236. doi:10.1097/01.asn.0000077408.15865.06

- Craven, P. A., Phillips, S. L., Melhem, M. F., Liachenko, J., & DeRubertis, F. R. (2001). Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses increases in collagen accumulation induced by culture of mesangial cells in high-media glucose. *Metabolism*, 50(9), 1043-1048. doi:10.1053/meta.2001.25802
- Cui, W., Bai, Y., Miao, X., Luo, P., Chen, Q., Tan, Y., . . . longevity, c. (2012). Prevention of diabetic nephropathy by sulforaphane: possible role of Nrf2 upregulation and activation. 2012.
- de Zeeuw, D., Akizawa, T., Audhya, P., Bakris, G. L., Chin, M., Christ-Schmidt, H., . . . Chertow, G. M. (2013). Bardoxolone Methyl in Type 2 Diabetes and Stage 4 Chronic Kidney Disease. 369(26), 2492-2503. doi:10.1056/NEJMoa1306033
- Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R., & Baynes, J. W. (1998). Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 44(7), 1139-1145.
- Dogan, M., Onar, L. C., Aydin, B., & Gumustas, S. A. (2019). Is high level of hemoglobin A1C an indicator for extended period of antibiotherapy in diabetic foot ulcers? *Northern clinics of Istanbul*, 6(1), 21-27. doi:10.14744/nci.2018.25582
- Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., . . . Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(22), 12222-12226. doi:10.1073/pnas.97.22.12222
- Eroglu, Z., Cetinkalp, S., Erdogan, M., Kosova, B., Karadeniz, M., Kutukculer, A., . . . Tuzun, M. (2008). Association of the angiotensinogen M235T and angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphisms in Turkish type 2 diabetic patients with and without nephropathy. *J Diabetes Complications*, 22(3), 186-190. doi:10.1016/j.jdiacomp.2006.12.004
- Figarska, S. M., Vonk, J. M., & Boezen, H. M. (2014). NFE2L2 polymorphisms, mortality, and metabolism in the general population. *Physiol Genomics*, 46(12), 411-417. doi:10.1152/physiolgenomics.00178.2013
- Fowler, M. J. (2008). Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*, 26(2), 77-82. doi:10.2337/diaclin.26.2.77 %J Clinical Diabetes
- Fox, C. S., Matsushita, K., Woodward, M., Bilo, H. J., Chalmers, J., Heerspink, H. J., . . . Nelson, R. G. (2012). Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis. *Lancet*, 380(9854), 1662-1673. doi:10.1016/s0140-6736(12)61350-6

- Geraldes, P., Hiraoka-Yamamoto, J., Matsumoto, M., Clermont, A., Leitges, M., Marette, A., . . . King, G. L. (2009). Activation of PKC- δ and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med*, 15(11), 1298-1306. doi:10.1038/nm.2052
- Go, M., Sekiguchi, K., Nomura, H., Kikkawa, U., & Nishizuka, Y. (1987). Further studies on the specificity of diacylglycerol for protein kinase C activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 144(2), 598-605. doi:10.1016/s0006-291x(87)80008-6
- Goto, H., Nishikawa, T., Sonoda, K., Kondo, T., Kukidome, D., Fujisawa, K., . . . Araki, E. (2008). Endothelial MnSOD overexpression prevents retinal VEGF expression in diabetic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(3), 814-820. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.041
- Haitoglou, C. S., Tsilibary, E. C., Brownlee, M., & Charonis, A. S. (1992). Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glucosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem*, 267(18), 12404-12407.
- Haji Zaine, N., Burns, J., Vicaretti, M., Fletcher, J. P., Begg, L., & Hitos, K. (2014). Characteristics of diabetic foot ulcers in Western Sydney, Australia. *Journal of Foot and Ankle Research*, 7(1), 39. doi:10.1186/s13047-014-0039-4
- Herman-Edelstein, M., Thomas, M. C., Thallas-Bonke, V., Saleem, M., Cooper, M. E., & Kantharidis, P. (2011). Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor- β : a model for diabetic podocytopathy. *Diabetes*, 60(6), 1779-1788. doi:10.2337/db10-1110
- Hicks, C. W., Selvarajah, S., Mathioudakis, N., Sherman, R. E., Hines, K. F., Black, J. H., 3rd, & Abularrage, C. J. (2016). Burden of Infected Diabetic Foot Ulcers on Hospital Admissions and Costs. *Ann Vasc Surg*, 33, 149-158. doi:10.1016/j.avsg.2015.11.025
- Hong, D. S., Kurzrock, R., Supko, J. G., He, X., Naing, A., Wheler, J., . . . Dezube, B. J. (2012). A phase I first-in-human trial of bardoxolone methyl in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *Clin Cancer Res*, 18(12), 3396-3406. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-11-2703
- Horie, K., Miyata, T., Maeda, K., Miyata, S., Sugiyama, S., Sakai, H., . . . Kurokawa, K. (1997). Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest*, 100(12), 2995-3004. doi:10.1172/jci119853
- IDF Diabetes Atlas 6th edn. <http://www.idf.org/diabetesatlas> (2013).
- Ioanid, C. P., Noica, N., & Pop, T. (1981). Incidence and diagnostic aspects of the bladder disorders in diabetics. *Eur Urol*, 7(4), 211-214. doi:10.1159/000473221

- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., . . . communications, b. r. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *236*(2), 313-322.
- Jiang, T., Huang, Z., Lin, Y., Zhang, Z., Fang, D., & Zhang, D. D. (2010). The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes*, *59*(4), 850-860. doi:10.2337/db09-1342
- Kajimoto, Y., & Kaneto, H. (2004). Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*, *1011*, 168-176. doi:10.1007/978-3-662-41088-2_17
- Kalvala, A. K., Kumar, R., Sherkhane, B., Gundu, C., Arruri, V. K., & Kumar, A. (2020). Bardoxolone Methyl Ameliorates Hyperglycemia Induced Mitochondrial Dysfunction by Activating the Keap1-Nrf2-ARE Pathway in Experimental Diabetic Neuropathy. *Mol Neurobiol*, *57*(8), 3616-3631. doi:10.1007/s12035-020-01989-0
- Khan, M. A. B., Hashim, M. J., King, J. K., Govender, R. D., Mustafa, H., & Al Kaabi, J. (2020). Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J Epidemiol Glob Health*, *10*(1), 107-111. doi:10.2991/jegh.k.191028.001
- Khunkaew, S., Fernandez, R., & Sim, J. (2019). Health-related quality of life among adults living with diabetic foot ulcers: a meta-analysis. *Quality of Life Research*, *28*(6), 1413-1427. doi:10.1007/s11136-018-2082-2
- Kirstein, M., Aston, C., Hintz, R., & Vlassara, H. (1992). Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest*, *90*(2), 439-446. doi:10.1172/jci115879
- Koriyama, Y., Chiba, K., Yamazaki, M., Suzuki, H., Muramoto, K., & Kato, S. (2010). Long-acting genipin derivative protects retinal ganglion cells from oxidative stress models in vitro and in vivo through the Nrf2/antioxidant response element signaling pathway. *J Neurochem*, *115*(1), 79-91. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06903.x
- Koya, D., Haneda, M., Nakagawa, H., Isshiki, K., Sato, H., Maeda, S., . . . Kikkawa, R. (2000). Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *Faseb j*, *14*(3), 439-447. doi:10.1096/fasebj.14.3.439
- Koya, D., Jirousek, M. R., Lin, Y. W., Ishii, H., Kuboki, K., & King, G. L. (1997). Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanooids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest*, *100*(1), 115-126. doi:10.1172/jci119503

- Kubo, E., Urakami, T., Fatma, N., Akagi, Y., & Singh, D. P. (2004). Polyol pathway-dependent osmotic and oxidative stresses in aldose reductase-mediated apoptosis in human lens epithelial cells: role of AOP2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(4), 1050-1056. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.002
- Lee, S., Hur, E.-g., Ryoo, I.-g., Jung, K.-A., Kwak, J., Kwak, M.-K. J. T., & pharmacology, a. (2012). Involvement of the Nrf2-proteasome pathway in the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic β -cells. 264(3), 431-438.
- Levey, A. S., Stevens, L. A., Schmid, C. H., Zhang, Y. L., Castro, A. F., 3rd, Feldman, H. I., . . . Coresh, J. (2009). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, 150(9), 604-612. doi:10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006
- Li, S., Eguchi, N., Lau, H., & Ichii, H. (2020). The Role of the Nrf2 Signaling in Obesity and Insulin Resistance. *Int J Mol Sci*, 21(18), 6973. doi:10.3390/ijms21186973
- Li, W., Wu, W., Song, H., Wang, F., Li, H., Chen, L., . . . Meyer, C. J. J. F. l. (2014). Targeting Nrf2 by dihydro-CDDO-trifluoroethyl amide enhances autophagic clearance and viability of β -cells in a setting of oxidative stress. 588(12), 2115-2124.
- Li, X., Xie, X., Lian, W., Shi, R., Han, S., Zhang, H., . . . Li, M. (2018). Exosomes from adipose-derived stem cells overexpressing Nrf2 accelerate cutaneous wound healing by promoting vascularization in a diabetic foot ulcer rat model. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4), 1-14. doi:10.1038/s12276-018-0058-5
- Liu, Y., Ma, C., Lv, L., Li, P., Ma, C., He, S., . . . Li, Y. (2020). Relationship between Decreased Serum Superoxide Dismutase Activity and Metabolic Syndrome: Synergistic Mediating Role of Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 5384909. doi:10.1155/2020/5384909
- Long, M., Rojo de la Vega, M., Wen, Q., Bharara, M., Jiang, T., Zhang, R., . . . Zhang, D. D. (2016). An Essential Role of NRF2 in Diabetic Wound Healing. *Diabetes*, 65(3), 780-793. doi:10.2337/db15-0564
- MacIsaac, R. J., Tsalamandris, C., Panagiotopoulos, S., Smith, T. J., McNeil, K. J., & Jerums, G. (2004). Nonalbuminuric renal insufficiency in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27(1), 195-200. doi:10.2337/diacare.27.1.195
- Magri, C. J., & Fava, S. (2009). The role of tubular injury in diabetic nephropathy. *European Journal of Internal Medicine*, 20(6), 551-555. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejim.2008.12.012
- Marczak, E. D., Marzec, J., Zeldin, D. C., Kleeberger, S. R., Brown, N. J., Pretorius, M., & Lee, C. R. (2012). Polymorphisms in the transcription factor NRF2 and

forearm vasodilator responses in humans. *Pharmacogenet Genomics*, 22(8), 620-628. doi:10.1097/FPC.0b013e32835516e5

- Martins-Mendes, D., Monteiro-Soares, M., Boyko, E. J., Ribeiro, M., Barata, P., Lima, J., . . . Complications, i. (2014). The independent contribution of diabetic foot ulcer on lower extremity amputation and mortality risk. 28(5), 632-638.
- Marzec, J. M., Christie, J. D., Reddy, S. P., Jedlicka, A. E., Vuong, H., Lanken, P. N., . . . Kleeberger, S. R. (2007). Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *Faseb j*, 21(9), 2237-2246. doi:10.1096/fj.06-7759com
- Maser, R. E., Mitchell, B. D., Vinik, A. I., & Freeman, R. (2003). The association between cardiovascular autonomic neuropathy and mortality in individuals with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*, 26(6), 1895-1901. doi:10.2337/diacare.26.6.1895
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., & Hayes, J. D. J. J. o. B. C. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. 278(24), 21592-21600.
- Meakin, P. J., Chowdhry, S., Sharma, R. S., Ashford, F. B., Walsh, S. V., McCrimmon, R. J., . . . biology, c. (2014). Susceptibility of Nrf2-null mice to steatohepatitis and cirrhosis upon consumption of a high-fat diet is associated with oxidative stress, perturbation of the unfolded protein response, and disturbance in the expression of metabolic enzymes but not with insulin resistance. 34(17), 3305-3320.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., & Kan, Y. W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(21), 9926-9930. doi:10.1073/pnas.91.21.9926
- Monteiro-Soares, M., Boyko, E. J., Ribeiro, J., Ribeiro, I., & Dinis-Ribeiro, M. (2012). Predictive factors for diabetic foot ulceration: a systematic review. *Diabetes Metab Res Rev*, 28(7), 574-600. doi:10.1002/dmrr.2319
- Negi, G., Kumar, A., & Sharma, S. S. (2011). Nrf2 and NF-κB modulation by sulforaphane counteracts multiple manifestations of diabetic neuropathy in rats and high glucose-induced changes. *Curr Neurovasc Res*, 8(4), 294-304. doi:10.2174/156720211798120972
- Negi, G., Kumar, A., & Sharma, S. S. J. J. o. p. r. (2011). Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF-κB and Nrf2 cascades. 50(2), 124-131.

- Nelson, R. G., Knowler, W. C., Pettitt, D. J., Saad, M. F., Charles, M. A., & Bennett, P. H. (1991). Assessment of risk of overt nephropathy in diabetic patients from albumin excretion in untimed urine specimens. *Arch Intern Med*, 151(9), 1761-1765.
- Nguyen, T., Nioi, P., & Pickett, C. B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*, 284(20), 13291-13295. doi:10.1074/jbc.R900010200
- Nishikawa, T., Edelstein, D., & Brownlee, M. (2000). The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl*, 77, S26-30. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.07705.x
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., . . . Brownlee, M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404(6779), 787-790. doi:10.1038/35008121
- Nishikawa, T., Kukidome, D., Sonoda, K., Fujisawa, K., Matsuhisa, T., Motoshima, H., . . . Araki, E. (2007). Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract*, 77(3, Supplement), S41-S45. doi:https://doi.org/10.1016/j.diabres.2007.01.031
- Nunes Dos Santos, K., Florentino, R. M., França, A., Lima Filho, A. C. M., Santos, M. L. D., Missiaggia, D., . . . Leite, M. F. (2019). Polymorphism in the Promoter Region of NFE2L2 Gene Is a Genetic Marker of Susceptibility to Cirrhosis Associated with Alcohol Abuse. *Int J Mol Sci*, 20(14). doi:10.3390/ijms20143589
- Oh, Y. S., & Jun, H. S. (2017). Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Oxidative Stress and Nrf2 Signaling. *Int J Mol Sci*, 19(1). doi:10.3390/ijms19010026
- Okano, Y., Nezu, U., Enokida, Y., Lee, M. T., Kinoshita, H., Lezhava, A., . . . Ishikawa, T. (2013). SNP (-617C>A) in ARE-like loci of the NRF2 gene: a new biomarker for prognosis of lung adenocarcinoma in Japanese non-smoking women. *PLoS One*, 8(9), e73794. doi:10.1371/journal.pone.0073794
- Pastore, D., Deja-Simoni, A., De Stefano, A., Pacifici, F., Cela, E., Infante, M., . . . Donadel, G. (2022). Risk factors for diabetic foot ulcers: an Albanian retrospective study of inpatients with type 2 diabetes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 26(2), 558-572. doi:10.26355/eurrev_202201_27883
- Penno, G., Solini, A., Bonora, E., Fondelli, C., Orsi, E., Zerbini, G., . . . Pugliese, G. (2011). Clinical significance of nonalbuminuric renal impairment in type 2 diabetes. *J Hypertens*, 29(9), 1802-1809. doi:10.1097/HJH.0b013e3283495cd6
- Pergola, P. E., Raskin, P., Toto, R. D., Meyer, C. J., Huff, J. W., Grossman, E. B., . . . Warnock, D. G. (2011). Bardoxolone Methyl and Kidney Function in CKD with Type 2 Diabetes. 365(4), 327-336. doi:10.1056/NEJMoa1105351

- Perrin, B. M., Allen, P., Gardner, M. J., Chappell, A., Phillips, B., Massey, C., . . . Skinner, T. C. (2019). The foot-health of people with diabetes in regional and rural Australia: baseline results from an observational cohort study. *Journal of Foot and Ankle Research*, 12(1), 56. doi:10.1186/s13047-019-0366-6
- Pi, J., Leung, L., Xue, P., Wang, W., Hou, Y., Liu, D., . . . Kurtz, T. W. J. J. o. B. C. (2010). Deficiency in the nuclear factor E2-related factor-2 transcription factor results in impaired adipogenesis and protects against diet-induced obesity. 285(12), 9292-9300.
- Pop-Busui, R., Boulton, A. J., Feldman, E. L., Bril, V., Freeman, R., Malik, R. A., . . . Ziegler, D. (2017). Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 40(1), 136-154. doi:10.2337/dc16-2042
- Pop-Busui, R., Evans, G. W., Gerstein, H. C., Fonseca, V., Fleg, J. L., Hoogwerf, B. J., . . . Prineas, R. J. D. c. (2010). Effects of cardiac autonomic dysfunction on mortality risk in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. 33(7), 1578-1584.
- Qian, Y., Feldman, E., Pennathur, S., Kretzler, M., & Brosius, F. C., 3rd. (2008). From fibrosis to sclerosis: mechanisms of glomerulosclerosis in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 57(6), 1439-1445. doi:10.2337/db08-0061
- Rastogi, A., Goyal, G., Kesavan, R., Bal, A., Kumar, H., Mangalanadanam, . . . Bhansali, A. (2020). Long term outcomes after incident diabetic foot ulcer: Multicenter large cohort prospective study (EDI-FOCUS investigators) epidemiology of diabetic foot complications study: Epidemiology of diabetic foot complications study. *Diabetes Res Clin Pract*, 162, 108113. doi:10.1016/j.diabres.2020.108113
- Robbins, J. M., Strauss, G., Aron, D., Long, J., Kuba, J., & Kaplan, Y. (2008). Mortality rates and diabetic foot ulcers: is it time to communicate mortality risk to patients with diabetic foot ulceration? *J Am Podiatr Med Assoc*, 98(6), 489-493. doi:10.7547/0980489
- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., . . . Williams, R. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract*, 157, 107843. doi:10.1016/j.diabres.2019.107843
- Samsom, M., Vermeijden, J., Smout, A., Van Doorn, E., Roelofs, J., Van Dam, P., . . . Van Berge-Henegouwen, G. J. D. c. (2003). Prevalence of delayed gastric emptying in diabetic patients and relationship to dyspeptic symptoms: a prospective study in unselected diabetic patients. 26(11), 3116-3122.
- Sarcinelli, C., Dragic, H., Piecyk, M., Barbet, V., Duret, C., Barthelaix, A., . . . Manié, S. N. (2020). ATF4-Dependent NRF2 Transcriptional Regulation

Promotes Antioxidant Protection during Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancers (Basel)*, 12(3). doi:10.3390/cancers12030569

- Satman, I., Omer, B., Tutuncu, Y., Kalaca, S., Gedik, S., Dinccag, N., . . . Tuomilehto, J. (2013). Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol*, 28(2), 169-180. doi:10.1007/s10654-013-9771-5
- Schmidt, A. M., Hori, O., Chen, J. X., Li, J. F., Crandall, J., Zhang, J., . . . Stern, D. (1995). Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest*, 96(3), 1395-1403. doi:10.1172/jci118175
- Shimoyama, Y., Mitsuda, Y., Hamajima, N., & Niwa, T. (2014). Polymorphisms of Nrf2, an antioxidative gene, are associated with blood pressure in Japanese. *Nagoya J Med Sci*, 76(1-2), 113-120.
- Shimoyama, Y., Mitsuda, Y., Tsuruta, Y., Hamajima, N., & Niwa, T. (2014). Polymorphism of Nrf2, an antioxidative gene, is associated with blood pressure and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Int J Med Sci*, 11(7), 726-731. doi:10.7150/ijms.8590
- Skolnik, E. Y., Yang, Z., Makita, Z., Radoff, S., Kirstein, M., & Vlassara, H. (1991). Human and rat mesangial cell receptors for glucose-modified proteins: potential role in kidney tissue remodelling and diabetic nephropathy. *J Exp Med*, 174(4), 931-939. doi:10.1084/jem.174.4.931
- Soares, M. A., Cohen, O. D., Low, Y. C., Sartor, R. A., Ellison, T., Anil, U., . . . Ceradini, D. J. (2016). Restoration of Nrf2 Signaling Normalizes the Regenerative Niche. *Diabetes*, 65(3), 633-646. doi:10.2337/db15-0453
- Song, P., Li, K., Liu, L., Wang, X., Jian, Z., Zhang, W., . . . Gao, T. (2016). Genetic polymorphism of the Nrf2 promoter region is associated with vitiligo risk in Han Chinese populations. *J Cell Mol Med*, 20(10), 1840-1850. doi:10.1111/jcmm.12874
- Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. (2003). *Diabetes Care*, 26 Suppl 1, S33-50. doi:10.2337/diacare.26.2007.s33
- Standards of Medical Care in Diabetes-2021. (2021). *Diabetes Care*, 44.
- Stitt, A. W., Li, Y. M., Gardiner, T. A., Bucala, R., Archer, D. B., & Vlassara, H. (1997). Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol*, 150(2), 523-531.

- Susztak, K., Raff, A. C., Schiffer, M., & Böttinger, E. P. (2006). Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 55(1), 225-233.
- Tapp, R. J., Shaw, J. E., de Courten, M. P., Dunstan, D. W., Welborn, T. A., & Zimmet, P. Z. (2003). Foot complications in Type 2 diabetes: an Australian population-based study. *Diabet Med*, 20(2), 105-113. doi:10.1046/j.1464-5491.2003.00881.x
- Tapp, R. J., Shaw, J. E., Zimmet, P. Z., Balkau, B., Chadban, S. J., Tonkin, A. M., . . . Atkins, R. C. (2004). Albuminuria is evident in the early stages of diabetes onset: results from the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). *Am J Kidney Dis*, 44(5), 792-798.
- Teena, R., Dhamodharan, U., Ali, D., Rajesh, K., & Ramkumar, K. M. (2020). Genetic Polymorphism of the Nrf2 Promoter Region (rs35652124) Is Associated with the Risk of Diabetic Foot Ulcers. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 9825028. doi:10.1155/2020/9825028
- Teena, R., Dhamodharan, U., Jayasuriya, R., Ali, D., Kesavan, R., & Ramkumar, K. M. (2021). Analysis of the Exonic Single Nucleotide Polymorphism rs182428269 of the NRF2 Gene in Patients with Diabetic Foot Ulcer. *Archives of Medical Research*, 52(2), 224-232. doi:https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.10.011
- Tesfamariam, B., Gupta, S., Oates, P. J., Ruderman, N. B., Cohen, R. A. J. A. J. o. P.-H., & Physiology, C. (1993). Reduced Na (+)-K⁺ pump activity in diabetic rabbit carotid artery: reversal by aldose reductase inhibition. 265(4), H1189-H1194.
- Tong, K. I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., & Yamamoto, M. (2006). Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol*, 26(8), 2887-2900. doi:10.1128/mcb.26.8.2887-2900.2006
- Toth, E., Racz, A., Toth, J., Kaminski, P. M., Wolin, M. S., Bagi, Z., . . . Physiology, C. (2007). Contribution of polyol pathway to arteriolar dysfunction in hyperglycemia. Role of oxidative stress, reduced NO, and enhanced PGH2/TXA2 mediation. 293(5), H3096-H3104.
- Toygar, I., Hancerlioglu, S., Yildirim-Simsir, I., & Cetinkalp, S. (2020). Diyabetik ayak hastalarının yaşam kalitesi ve etkileyen faktörler. *Ege Journal of Medicine*, 59(4), 8.
- Tsilibary, E. C., Charonis, A., Reger, L., Wohlhueter, R., & Furcht, L. J. J. o. B. C. (1988). The effect of nonenzymatic glucosylation on the binding of the main noncollagenous NC1 domain to type IV collagen. 263(9), 4302-4308.
- Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu, 2020.

- Umapathy, D., Krishnamoorthy, E., Mariappanadar, V., Viswanathan, V., & Ramkumar, K. M. (2018). Increased levels of circulating (TNF- α) is associated with (-308G/A) promoter polymorphism of TNF- α gene in Diabetic Nephropathy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2113-2121. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.078>
- Ungvári, I., Hadadi, E., Virág, V., Nagy, A., Kiss, A., Kalmár, A., . . . Szalai, C. (2012). Relationship between air pollution, NFE2L2 gene polymorphisms and childhood asthma in a Hungarian population. *J Community Genet*, 3(1), 25-33. doi:10.1007/s12687-011-0075-8
- Unnikrishnan, R. I., Rema, M., Pradeepa, R., Deepa, M., Shanthirani, C. S., Deepa, R., & Mohan, V. (2007). Prevalence and risk factors of diabetic nephropathy in an urban South Indian population: the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES 45). *Diabetes Care*, 30(8), 2019-2024. doi:10.2337/dc06-2554
- Uruno, A., Furusawa, Y., Yagishita, Y., Fukutomi, T., Muramatsu, H., Negishi, T., . . . biology, c. (2013). The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. 33(15), 2996-3010.
- Uysal, S., Arda, B., Taşbakan, M. I., Çetinkalp, Ş., Şimşir, I. Y., Öztürk, A. M., . . . Ertam, I. J. I. w. j. (2017). Risk factors for amputation in patients with diabetic foot infection: a prospective study. 14(6), 1219-1224.
- Vadiveloo, T., Jeffcoate, W., Donnan, P. T., Colhoun, H. C., McGurnaghan, S., Wild, S., . . . Leese, G. P. (2018). Amputation-free survival in 17,353 people at high risk for foot ulceration in diabetes: a national observational study. *Diabetologia*, 61(12), 2590-2597. doi:10.1007/s00125-018-4723-y
- Vincent, A. M., Russell, J. W., Sullivan, K. A., Backus, C., Hayes, J. M., McLean, L. L., & Feldman, E. L. (2007). SOD2 protects neurons from injury in cell culture and animal models of diabetic neuropathy. *Experimental Neurology*, 208(2), 216-227. doi:<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.07.017>
- von Otter, M., Landgren, S., Nilsson, S., Celojovic, D., Bergström, P., Håkansson, A., . . . Zetterberg, H. (2010). Association of Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes with Parkinson's disease. *BMC Med Genet*, 11, 36. doi:10.1186/1471-2350-11-36
- Wada, T., Shimizu, M., Yokoyama, H., Iwata, Y., Sakai, Y., Kaneko, S., & Furuichi, K. (2013). Nodular lesions and mesangiolysis in diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol*, 17(1), 3-9. doi:10.1007/s10157-012-0711-6
- Wang, J., Yu, M., Chen, J., Zhu, L., Liu, J., & Xu, J. (2021). Association of Nuclear Factor Erythroid-2-Related Actor 2 Gene Polymorphisms with Diabetic Nephropathy in Chinese Patients. *Int J Gen Med*, 14, 1231-1237. doi:10.2147/ijgm.S300152

- Wyld, M. L. R., Morton, R. L., Aouad, L., Magliano, D., Polkinghorne, K. R., & Chadban, S. (2021). The impact of comorbid chronic kidney disease and diabetes on health-related quality-of-life: a 12-year community cohort study. *Nephrol Dial Transplant*, 36(6), 1048-1056. doi:10.1093/ndt/gfaa031
- Xia, P., Inoguchi, T., Kern, T. S., Engerman, R. L., Oates, P. J., & King, G. L. (1994). Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*, 43(9), 1122-1129. doi:10.2337/diab.43.9.1122
- Xu, X., Sun, J., Chang, X., Wang, J., Luo, M., Wintergerst, K. A., . . . Cai, L. (2016). Genetic variants of nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 associated with the complications in Han descents with type 2 diabetes mellitus of Northeast China. *J Cell Mol Med*, 20(11), 2078-2088. doi:10.1111/jcmm.12900
- Yagishita, Y., Uruno, A., Fukutomi, T., Saito, R., Saigusa, D., Pi, J., . . . Yamamoto, M. J. C. R. (2017). Nrf2 improves leptin and insulin resistance provoked by hypothalamic oxidative stress. *18*(8), 2030-2044.
- Yazdanpanah, L., Shahbazian, H., Nazari, I., Arti, H. R., Ahmadi, F., Mohammadianinejad, S. E., . . . Hesam, S. (2018). Incidence and Risk Factors of Diabetic Foot Ulcer: A Population-Based Diabetic Foot Cohort (ADFC Study)-Two-Year Follow-Up Study. *Int J Endocrinol*, 2018, 7631659. doi:10.1155/2018/7631659
- Yoh, K., Hirayama, A., Ishizaki, K., Yamada, A., Takeuchi, M., Yamagishi, S., . . . Yamamoto, M. (2008). Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. *Genes Cells*, 13(11), 1159-1170. doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01234.x
- Zazueta, C., Jimenez-Urbe, A. P., Pedraza-Chaverri, J., & Buelna-Chontal, M. (2022). Genetic Variations on Redox Control in Cardiometabolic Diseases: The Role of Nrf2. *11*(3), 507.
- Zhang, D. D., Hannink, M. J. M., & biology, c. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *23*(22), 8137-8151.
- Zhang, P., Lu, J., Jing, Y., Tang, S., Zhu, D., & Bi, Y. (2017). Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis (†). *Ann Med*, 49(2), 106-116. doi:10.1080/07853890.2016.1231932
- Zhang, Y. K., Wu, K. C., Liu, J., & Klaassen, C. D. (2012). Nrf2 deficiency improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet. *Toxicol Appl Pharmacol*, 264(3), 305-314. doi:10.1016/j.taap.2012.09.014
- Zheng, H., Whitman, S. A., Wu, W., Wondrak, G. T., Wong, P. K., Fang, D., & Zhang, D. D. (2011). Therapeutic potential of Nrf2 activators in

streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes*, 60(11), 3055-3066.
doi:10.2337/db11-0807

Ziegler, D., Papanas, N., Vinik, A. I., & Shaw, J. E. (2014). Epidemiology of polyneuropathy in diabetes and prediabetes. *Handb Clin Neurol*, 126, 3-22.
doi:10.1016/b978-0-444-53480-4.00001-1

Ekler

Ek-1 Etik Kurul Onay Belgesi



EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel: 0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34
e-mail: aetikk@mail.ege.edu.tr www.aek.med.ege.edu.tr



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İki Önemli Diyabet Komplikasyonunun Nrf2 Gen Polimorfizmleri İle İlişkisinin Değerlendirilmesi		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Zuhar EROĞLU		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-		
	DESTEKLEYİCİ	Bilimsel Araştırmalar Proje Fonu		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	-		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐ FAZ 2 ☐ FAZ 3 ☐ FAZ 4 ☐ Gözlemsel İlaç Çalışması ☐ Tıbbi Cihaz Klinik Araştırması ☐ İn Vitro Tıbbi Tanı Cihazları İle Yapılan Performans Değerlendirme Çalışmaları ☐ İlaç Dışı Klinik Araştırma ☒ Diğer ise belirtiniz:		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐ ULUSAL ☒ ULUSLARARASI ☐			
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	19.02.2018	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	19.02.2018	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	-	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒ imza tarihi: 19.12.2017		
KARAR BİLGİLERİ	DIĞER	☐		
	Karar Nu: 18-3/31	Tarih: 06.03.2018		
Yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğu oy birliği ile karar verilmiştir.				
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU				
ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği		
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Ayşe EROL		
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)
Prof. Dr. Ayşe EROL Başkan	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H
Prof. Dr. Mine HEKİMGİL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Patoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD	K	☐ E ☒ H
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	☐ E ☒ H
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı:		Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:
Prof. Dr. Ayşe EROL			22	17.10.2017/06
				Sayfa
				1/2

Ek-2 Olgu Rapor Formu

İki önemli diyabet komplikasyonunun Nrf2 gen polimorfizmleri ile ilişkisinin değerlendirilmesi

Tarih :

Olgu No:

Yaş:

Cinsiyet: K () E ()

Kilo:

Boy:

Kan basıncı:

Diyabet tanı zamanı:

Diyabetik nefropati tanı zamanı:

Diyabetik ayak tanı zamanı:

Diğer kronik hastalıkları ve tanı zamanları:

Hipertansiyon (), varsa tanı zamanı:

Koroner arter hast. (), varsa tanı zamanı:

Periferik arter hast. (), varsa tanı zamanı:

Diğer:

Glukoz:	Total kolesterol:
Üre/kreatinin:	HDL:
AST/ALT:	LDL:
HbA1c:	Trigliserid:
CRP:	TIT:
Lokosit:	İdrar albüminüri:
Hb:	
Plt:	

rs35652124 genotip:
rs6706649 genotip:
rs6721961 genotip:

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık

Sizi Doç. Dr. Zuhale Eroğlu ve Dr. Aygöl Çeltik tarafından yürütülen “İki önemli diyabet komplikasyonunun Nrf2 gen polimorfizmleri ile ilişkisinin değerlendirilmesi” başlıklı araştırmaya davet ediyoruz.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni size diyabet tanısının konulmuş olmasıdır. Şeker hastalığı; böbrek, kalp, göz, beyin gibi birçok organı damar tahribatı yaparak etkilemektedir. Bu organların işlevlerini bozarak böbrek yetmezliği, körlük, kalp hastalıkları gibi hastalıklara neden olmaktadır.

Bu çalışmamızda amacımız, sağlıklı insanlarda kalp damar hastalıkları ile ilişkili olduğu gösterilmiş bir genin bazı alanlarındaki gen dizilimlerinin şeker hastalığına bağlı böbrek hasarlanmasına ve ayakta iyileşmesi zor yaralara neden olup olmadığının belirlenmesidir. Bu genin adı Nrf2 genidir. Araştırmaya katılacak gönüllü sayısı 260’ dır. Diyabete bağlı böbrek hastalığı olan 110 gönüllü ve diyabete bağlı ayağında yaraları olan 60 gönüllü çalışmaya alınacaktır. Diyabeti olan fakat böbrek hastalığı ve ayak yaraları olmayan 90 gönüllü de çalışmaya davet edilecektir. Sözünü ettiğimiz Nrf2 geninin bazı gen dizilimlerinin böbrek tutulumu olan ve diyabetik ayak yaraları olan hastalarda daha fazla saptanıp saptanmadığı araştırılacaktır. Eğer bu dizilimler daha sık saptanırsa, gelecekte, şeker hastalığı

tanısı konulur konulmaz bu gen dizilimlerinin belirlenmesi ile hangi hastalarda böbrek hasarlanması veya ayak yaralarının ortaya çıkma riskinin yüksek olacağını göstermede ve uygun takip ve tedavi uygulanmasında kullanılabilir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Doç. Dr. Zuhale Eroğlu ve Dr. Aygöl Çeltik tarafından verileriniz ve bulgularınız kaydedilecektir. Bu kayıtlar ileride tekrar incelenerek doğru tanı konulmasına yardımcı olacaktır. Bu kayıtlar kimliğiniz belirtilmeden tıp öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmayı yapabilmek için kolunuzdan 4 mL (2 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Bu kandan genetik materyal, DNA elde edilecektir. Bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Yapılacak test bağlı olduğunuz sağlık giderlerinizi karşılamak ile yükümlü olan kuruluşa herhangi bir mali yük getirmeyecektir.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya kan alma bölgesinde morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Size ait genetik bilginin gizli kalacağına dair elimizden geleni yapacağız. Bu araştırma sonuçları ve sizin bu geni taşıyıp taşımadığınız konusunda bilgi siz onay verirsiniz size verilecektir. Böylesi bir bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Yaptığımız test sizin ileride bu hastalıktan etkilenebileceğinizi ortaya çıkarabilir. Eğer bu geni taşıdığınızı öğrenirseniz, bu genin neden olduğu hastalığın ortaya çıkmasının engellenmesi veya geciktirilmesi için takip ve tedavi olabilirsiniz. Böyle bir gene sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden olumsuz etkileyebilir. Öğrenmemeniz durumunda ise, bu hastalık ile ilgili geni taşıyıp taşımayacağınızı öğrenmediğiniz için önlem alma, erken tanı ve tedavi seçeneğiniz olmayabilir. Yine hemen belirtmeliyiz ki; bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninizle olacaktır.

Yukarıda sayılanlar böylesi bir analizde yaşanabilecek potansiyel risklerdir. Ancak bunlardan en az oranda zarar görmeyi sağlamak için elimizden geleni yapacağız. Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek sorun ve riskler katılımcının/hastanın kendisine ya da ebeveyni/sorumlusuna iletilecektir.

Yapılacak genetik testin getireceği olası yararlar: Böyle bir analiz ilgili hastalığın nedeninin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Şu anda bu çalışmanın hemen fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak ilgili hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ileride ilgili hastalıktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Eğer örneğinizin imha edilmesine karar vererseniz, bu isteğinizden önce üretilmiş her türlü veri ve yapılmış analiz ortadan kaldırılmayacak ama daha fazla analiz yapılmayacaktır. Aksi halde, saklama süresinin sonunda örneğin imha edilmesinden destekleyici/araştırmacı sorumludur.

Sayın Doç. Dr. Zuhal Eroğlu ve Dr. Aygöl Çeltik tarafından Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD’da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, [REDACTED] numaralı telefonda ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji [REDACTED] numaralı telefonda arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

Gönüllülerden elde edilen biyolojik materyaller üzerinde genetik araştırma yapılabilmesi için Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunda (BGOF): “Tip 2 Diyabetes Mellitus Olan Hastalarda, Diyabetik Nefropati ile Nrf2 Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi” adlı çalışma kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan);

- ☐ Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ İleride yapılması planlanan ilgili hastalık grubu ile sınırlandırılmış araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.”

şeklinde gönüllünün konu ile ilgili rızası, Etik Kurul onayı ve Sağlık Bakanlığı izni alınmak suretiyle yapılması gerekmektedir.

O Araştırmanın sonucu konusunda tarafıma bilgi verilmesini istiyorum.

O Araştırmanın sonucu konusunda tarafıma bilgi verilmesini istemiyorum.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

1.1.1. GÖNÜLLÜNÜN		1.1.2. İMZASI
1.1.2.1. ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

ARAşTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAşTIRMACININ		1.1.4. İMZASI
1.1.3.		
1.1.4.1. ADI & SOYADI		
1.1.4.2. TARİH		

1.1.5. GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		1.1.6. İMZASI
1.1.6.1. ADI & SOYADI		
1.1.6.2. GÖREVİ		
1.1.6.3. TARİH		

Teşekkür

Bu süreçte her anımda bana desteğini esirgemeyen başta tez danışman hocam Sn. Doç. Dr. Zuhal Eroğlu ve Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı başkanı Sn. Prof. Dr. Cumhur Gündüz olmak üzere tüm Tıbbi Biyoloji öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım. Nefroloji yan dal eğitimim boyunca ve sonrasında her zaman bana destek olan Nefroloji Bilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ercan Ok, Prof. Dr. Hüseyin Töz, Prof. Dr. Mehmet Özkahya, Prof. Dr. Gülay Aşçı, Prof. Dr. Meltem Seziş Demirci ve Doç. Dr. Mümtaz Yılmaz' a teşekkürlerimi sunarım. Endokrinoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Şevki Çetinkalp ve Doç. Dr. Ilgın Yıldırım Şimşir' e teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte, laboratuvarında birlikte çalışmaktan keyif aldığım doktora öğrencisi Büşra Bara' ya teşekkürlerimi sunarım. Bu tez çalışması Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiş olup, BAP birimine desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 2.08.2022

Aygül ÇELTİK

Özgeçmiş

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Uğur Derman İngilizce Tıp Programı'ndan 2004 yılında mezun olmuştur. 2005-2010 yıllarında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde İç Hastalıkları Ana Bilim Dalında İç Hastalıkları uzmanlık eğitimi almıştır. 2011-2014 yıllarında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Nefroloji Bilim Dalında Nefroloji yan dal uzmanlık eğitimi almıştır. 2017 yılında beri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalında uzman doktor olarak çalışmaktadır.