

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TİP 2 DİYABETİK NEFROPATİLİ HASTALARDA  
MİKRORNA'LAR**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. KADRIYE AKPINAR**

TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. DİLER ASLAN

**DENİZLİ-2019**

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TİP 2 DİYABETİK NEFROPATİLİ HASTALARDA**  
**MİKRORNA'LAR**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. KADRIYE AKPINAR**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF. DR. DİLER ASLAN**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 26.12.2017 tarih ve 2017TIPF018 nolu kararı ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ - 2019**

Prof. Dr. Diler Aslan danışmanlığında Dr. Kadriye Akpınar tarafından yapılan “Tip 2 diyabetik nefropatili hastalarda mikroRNA’lar” başlıklı tez çalışması 18/01/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**BAŞKAN**

**Prof. Dr. Süleyman Demir**

**ÜYE**

**Prof. Dr. Diler Aslan**

**ÜYE**

**Prof. Dr. Aylin Sepici Dinçel**

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

**Prof. Dr. Osman Çiftçi**

**Pamukkale Üniversitesi**

**Tıp Fakültesi Dekanı**

## TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında aldığım eğitimim boyunca ilgi ve desteğini aldığım, tez çalışmamın başlangıcından sonuna kadar her adımda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Prof. Dr. Diler ASLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım Prof. Dr. Süleyman DEMİR, Prof. Dr. Hülya AYBEK, Prof. Dr. Yaşar ENLİ, Öğr. Üyesi Dr. Esin AVCI ve Öğr. Üyesi Dr. Rukiye NAR 'a eğitimime yaptıkları katkılar için teşekkür ederim. Örneklerin toplanması için kliniğini bize açan Prof. Dr. Semin Melahat FENKÇİ'ye, örneklerin analizinde deneyimlerinden yararlandığım Prof. Dr. Vildan CANER'e, tezimin istatistik çalışmaları konusunda bana destek olan sevgili Öğr. Gör. Hande ŞENOL'a, eğitimim süresince birlikte görev yaptığım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Elif FIRAT ve Uzm. Dr. Fahrigür DEDE'ye, uzmanlık eğitimim süresince destek ve anlayışlarından dolayı merkez laboratuvarında çalışsam tüm personele teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda her türlü fedakarlık ve desteğini benden esirgemeyen ve hep yanımda olan canım eşim Kemal AKPINAR'a ve doğumu ile hayatımızı daha da anlamlandıran biricik oğlum Eren AKPINAR'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
KISALTMALAR .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ .....	X
ÖZET .....	XII
İNGİLİZCE ÖZET .....	XV
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
DIABETES MELLİTUS .....	3
TANIM.....	3
EPİDEMİYOLOJİ .....	3
SINIFLANDIRMA .....	3
TİP 1 DiABETES MELLİTUS.....	4
TİP 2 DiABETES MELLİTUS.....	4
DiABETES MELLİTUS'UN TANISI .....	6
DiABETES MELLİTUS'UN TANI VE İZLEMİNDE KULLANILAN TESTLER.....	7
DIABETES MELLİTUS'UN KOMPLİKASYONLARI .....	10
DiYABETİK NEFROPATİ .....	13
MİKRORNALAR (MİRNALAR).....	15
MİRNA'LARIN TARİHÇESİ .....	15
MİRNA'LARIN İSİMLENDİRİLMESİ .....	16
MİRNA GENLERİ .....	16
MİRNA'LARIN BiYOGENEZİ.....	17
MİRNA'LARIN SALINIMI .....	18
MİRNA'LARIN İŞLEVİ.....	18
DiYABETİK NEFROPATİDE MİRNA'LARIN İŞLEVİ.....	19
GEREÇ VE YÖNTEM.....	24

<b>ÇALIŞMA GRUBU</b> .....	24
<b>HASTA GRUBU</b> .....	24
<b>KONTROL GRUBU</b> .....	24
<b>HASTA ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI VE ANALİZ ÖRNEKLERİNİN</b> <b>HAZIRLANMASI</b> .....	24
<b>ETİK KURUL ONAYI</b> .....	25
<b>KULLANILAN MALZEMELER VE CİHAZLAR</b> .....	25
<b>KULLANILAN CİHAZLAR</b> .....	25
<b>KULLANILAN SARF MALZEMELERİ</b> .....	26
<b>BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER</b> .....	27
<b>ÖLÇÜLEN ANALİTLER</b> .....	27
<b>ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ</b> .....	27
<b>MİRNA ANALİZİ</b> .....	32
<b>TOTAL RNA İZOLASYONU</b> .....	32
<b>TOTAL RNA'DAN KOMPLEMENTER DNA (CDNA) ELDESİ</b> .....	34
<b>REAL TIME-PCR ANALİZİ</b> .....	35
<b>KALİTE KONTROL</b> .....	40
<b>İSTATİKSEL ANALİZ</b> .....	40
<b>BULGULAR</b> .....	42
<b>KALİTE KONTROL SONUÇLARI</b> .....	42
<b>ÇALIŞMA GRUPLARININ ÖZELLİKLERİ VE</b> <b>BİYOKİMYASAL ÖLÇÜM SONUÇLARI</b> .....	44
<b>MİRNA ANALİZ SONUÇLARI</b> .....	46
<b>MİRNA'LAR İLE BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER</b> <b>ARASINDAKİ İLİŞKİ</b> .....	54
<b>DİYABETİK NEFROPATİ TANISINDA MİRNA GÖRECELİ</b> <b>EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN BİYOKİMYASAL</b> <b>HESAPLAMALAR İLE KARŞILAŞTIRILMASI.</b> .....	56
<b>TARTIŞMA</b> .....	59
<b>SONUÇLAR</b> .....	72
<b>KAYNAKLAR</b> .....	74

## KISALTMALAR

<b>ACE</b>	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
<b>Ago2</b>	: Argonaute proteini 2
<b>AKT kinaz</b>	: V-Akt murin timoma viral onkogen homolog 1 kinaz
<b>ARB</b>	: Anjiyotensin reseptör blokörleri
<b>AUC</b>	: Area Under Curve
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>CKD-EPI</b>	: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
<b>CKD-EPI-kre</b>	: CKD-EPI-kreatinin
<b>CKD-EPI-Sis C</b>	: CKD-EPI- sistatin C
<b>Colla-1 ve -2</b>	: Kollajen 1 $\alpha$ -1 ve -2
<b>CRP</b>	: C-reaktif protein
<b>Ct</b>	: Thershold cycle
<b>DCCT</b>	: Diyabet Kontrolü ve Komplikasyonları Çalışması
<b>DKB</b>	: Diastolik kan basıncı
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DN</b>	: Diyabetik Nefropati
<b><math>\Delta</math>Ct</b>	: İlgili genin Ct değeri – referans genin Ct değeri
<b>ECM</b>	: Ekstraselüler matriks
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetik asit
<b>eGFR</b>	: Hesaplanan glomerüler filtrason hızı
<b>EMT</b>	: Epitelyal mezengiyal geçiş
<b>FPG</b>	: Fasting plasma glucose, açlık plazma glukoza
<b>GBM</b>	: Glomerüler bazal membran
<b>GDM</b>	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
<b>GFR</b>	: Glomerüler filtrasyon hızı
<b>HbA1c</b>	: Glike hemoglobin
<b>HDL-kol</b>	: HDL-kolesterol
<b>İ. Kreatinin</b>	: İdrar kreatinin
<b>IFG</b>	: Impaired fasting glucose, bozulmuş açlık glukoza
<b>IGT</b>	: Impaired glucose tolerance, bozulmuş glukoz toleransı

<b>LDL-kol</b>	: LDL-kolesterol
<b>MakAlb</b>	: Makroalbuminüri
<b>MDRD</b>	: The Modification of Diet in Renal Disease
<b>MikAlb</b>	: Mikroalbuminüri
<b>miRNA</b>	: Mikroribonükleik asit, mikroRNA
<b>MODY</b>	: Maturity-onset diyabet
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b>NAIb</b>	: Normoalbuminüri
<b>NF-kB</b>	: Nuclear factor kappa B
<b>NGSP</b>	: Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı
<b>OGTT</b>	: Oral glukoz tolerans testi
<b>PCR</b>	: Polimeraz Chain Reaction
<b>PIK3R2</b>	: Fosfoinozitol-3 kinaz düzenleyici alt-birimi 2
<b>PTEN</b>	: Phosphatase and tensin homolog
<b>RNA pol II</b>	: RNA polimeraz II
<b>ROC</b>	: Receiver Operating Characteristic
<b>RT-PCR</b>	: Real-Time PCR
<b>S. kreatinin</b>	: Serum kreatinin
<b>SDBH</b>	: Son dönem böbrek hastalığı
<b>SIP-1</b>	: Smad Interacting protein 1-SIP1
<b>Sis C</b>	: Sistatin C
<b>SKB</b>	: Sistolik kan basıncı
<b>SPRED1</b>	: Sprouty-ilişkili protein
<b>STZ</b>	: Streptozosin
<b>T. kolesterol</b>	: Total kolesterol
<b>TG</b>	: Trigliserit
<b>TGF-β</b>	: Transforme edici büyüme faktörü beta
<b>TSP-1</b>	: Trombospondin-1
<b>VKI</b>	: Vücut kütle indeksi
<b>VLDL-kol</b>	: VLDL-kolesterol
<b>ZEB</b>	: Zinc finger E-box-binding homeobox



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> miRNA genlerinin yerleşimi: A: İntronik, B: Ekzonik, C: Protein kodlayan ve kodlamayan genlerdeki ‘mixed’ yerleşim .....	17
<b>Şekil 2.</b> miRNA’ların biyogenezi .....	18
<b>Şekil 3.</b> miRNA biyogenezi ve ekstraselüler ortama miRNA’ların salınımı... ..	19
<b>Şekil 4.</b> miRNA-21a-3p, miRNA-29a-3p, miRNA-29b-3p, miRNA-29c-3p, miRNA-126-3p, miRNA-129-1-3p, miRNA-137, miRNA-192-5p, miRNA-212-3p, miRNA-320c ve U6 referans genin RT-PCR ekspresyonlarının (A) ve erime eğrilerinin (B) görüntüleri.....	38
<b>Şekil 5.</b> SYBR Green I yöntemi .....	40
<b>Şekil 6.</b> Tüm diyabetik hastaların miRNA göreceli ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişim oranları (kat değişimi, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) .....	48
<b>Şekil 7.</b> Diyabetik nefropatili grubunun miRNA göreceli ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişim oranları (kat değişimi, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ).....	49
<b>Şekil 8.</b> Diyabetik alt grupların miRNA göreceli ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişim oranları (kat değişimi, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) .....	51
<b>Şekil 9.</b> Kontrol grubu ve diyabetik grupların miRNA-21-3p göreceli ekspresyon değerleri .....	52
<b>Şekil 10.</b> Kontrol grubu, normoalbuminürik diyabetik (NALb) ve diyabetik nefropatili (DN) hastaların miRNA-21-3p göreceli ekspresyon değerleri.....	53
<b>Şekil 11.</b> Kontrol grubu, normoalbuminürik diyabetik (NALb) ve diyabetik nefropatili (DN) hastaların miRNA-192-5p göreceli ekspresyon değerleri.....	54
<b>Şekil 12.</b> Diyabetik nefropatili hastalar ile diyabetik normoalbuminürik hastaları ayırmada kreatinin klirensi, CKD-EPI-kre, MDRD, CKD-EPI-sis C eGFR hesaplamalarına ait ROC eğrileri .....	57
<b>Şekil 13.</b> Diyabetik nefropatili hastalar ile kontrol grubunu ayırmada miRNA 21-3p ve miRNA 192-5p göreceli ekspresyon düzeylerine ait ROC grafikleri.....	58

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Diabetes Mellitus'un etyolojik sınıflandırılması.....	5
<b>Tablo 2.</b> Diabetes Mellitus'un tanı kriterleri.....	6
<b>Tablo 3.</b> Prediyabet tanı kriterleri .....	7
<b>Tablo 4.</b> Albumin atılımındaki anormalliklerin tanımları.....	9
<b>Tablo 5.</b> GFR değerlendirilmesinde kullanılan bazı denklemler.....	11
<b>Tablo 6.</b> Diabetes Mellitus'un komplikasyonları.....	12
<b>Tablo 7.</b> Kronik böbrek hastalığı prognozunun eGFR ve mikroalbuminüriye göre sınıflandırılması .....	15
<b>Tablo 8.</b> Diyabetik nefropati ile ilişkili miRNA'lar.....	22
<b>Tablo 9.</b> cDNA sentezi için PCR protokolü .....	34
<b>Tablo 10.</b> Bir örnek için cDNA sentez protokolü.....	35
<b>Tablo 11.</b> Hedef miRNA dizileri .....	36
<b>Tablo 12.</b> Hedef genin RT-PCR protokolü.....	37
<b>Tablo 13.</b> RT-PCR 1S1 protokolü.....	37
<b>Tablo 14.</b> Biyokimyasal testlerin analitik performansı.....	42
<b>Tablo 15.</b> Biyokimyasal testlerin aralık 2017, ocak ve şubat 2018 dış kalite kontrol sonuçları .....	43
<b>Tablo 16.</b> Albumin atılım gruplarına göre bireylerin özellikleri ve biyokimyasal ölçüm sonuçları .....	44
<b>Tablo 17.</b> Albumin atılım gruplarındaki farklılıkların dağılımı.....	45
<b>Tablo 18.</b> Kontrol grubunun ve albumin atılım gruplarına göre hastaların miRNA göreceli ekspresyon ( $2^{-\Delta Ct}$ ) değerleri .....	47
<b>Tablo 19.</b> Kontrol grubu ve albumin atılım gruplarına göre hastaların miRNA göreceli ekspresyon değerlerinin birbirine oranları (kat değişimi, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) .....	50
<b>Tablo 20.</b> miRNA göreceli ekspresyon düzeyleri ile 24 saatlik idrarda mikroalbumin, kreatinin klirensi ve eGFRler (CKD-EPI-kre, CKD-EPI-sis C, MDRD) arasındaki ilişki.....	55
<b>Tablo 21.</b> Diyabetik nefropatili hastalar ile diyabetik normoalbuminürik hastaları ayırmada kreatinin klirensi, CKD-EPI-kre, MDRD ve CKD-EPI-sis C eGFR hesaplamalarına ait AUC ve p değerleri.....	57

**Tablo 22.** Diyabetik nefropatili hastalar ve kontrol grubu ayırımında miRNA 21-3p ve miRNA 192-5p göreceli ekspresyon düzeylerine ait AUC ve p değerleri.. 58

## ÖZET

### Tip 2 diyabetik hastalarda mikroRNA'lar

Dr. Kadriye Akpınar

Çok sayıda dokudan salgılanarak çok sayıda doku ve hücrede etki gösteren mikroribonükleik asitler (mikroRNA/miRNA/miR-) kalp, karaciğer, beyin ve böbrek gibi organlardaki bozukluk ve hastalıklarda, endotel hasarı ve fibrozis başta olmak üzere çeşitli olayların gelişmesinde veya engellenmesinde rol oynamaktadır. Önemli bir halk sağlığı sorunu olan diyabetik nefropatinin (DN) tanısı ve takibinde kullanılan mikroalbuminüri ancak renal hasar geliştikten sonra pozitif sonuç vermektedir. miRNA'ların renal hasarın erken tanısında yararlı olabileceği öngörülmektedir. Çalışmamızda, diyabetle ilişkili olduğu saptanan, insanda araştırılmış olan “miRNA-21-3p, miRNA-29a-3p, miRNA-29b-3p, miRNA-29c-3p, miRNA-126-3p, miRNA-192-5p, miRNA-320c” ve farelerde araştırılan “miRNA-129-1-3p, miRNA-137, miRNA-212-3p” olmak üzere 10 miRNA'yı değerlendirmeyi amaçladık.

Çalışma grubu, 50 sağlıklı kontrol (erkek: n=24; yaş: 55±11; kadın: n=26; yaş: 54±13) ve 100 tip 2 diyabetik hastadan (erkek: n= 46; yaş: 60±11; kadın: n=54; yaş: 56±11)] oluşturuldu. Diyabetik hastalar 51'i normoalbuminürik (NAIb), 25'i mikroalbuminürik (MikAlb) ve 24'ü makroalbuminürik (MakAlb) olmak üzere alt gruplara ayrıldı. Diyabetik grup (T2DM), 51 NAIb ve 49 diyabetik nefropatili (DN) hastayı kapsadı. Tüm bireylerin plazmalarında RT-PCR yöntemi ile miRNA'lar analiz edildi. Serumda açlık glukozu, total kolesterol, trigliseritler, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, sistatin C, kreatinin, albumin; tam kanda HbA1c ve 24 saatlik idrarda mikroalbumin ve kreatinin düzeyleri ölçüldü. 24 saatlik idrar toplanarak kreatinin klirensi hesaplandı. Serum kreatinin ve serum sistatin C düzeylerine göre glomerüler filtrasyon hızları hesaplandı (eGFR). Her miRNA'nın ekspresyonu tüm diyabetik grupların kendi arasında ve kontrol grubuyla karşılaştırıldı ve ekspresyonların biyokimyasal ölçüm sonuçlarıyla korelasyonları değerlendirildi.

İnsanlarda araştırılmış olan ilk 7 miRNA'dan yalnız miRNA-21 çalışma grubu bireylerinin yarısında, diğerleri tüm bireylerde saptandı. Farelerde araştırılmış olan miRNA-129-1-3p ve miRNA-137 çalışma gruplarının az bir kısmında saptandı ve

yeterli sayıda olmadığı için değerlendirilmedi. miRNA-212 ise tüm bireylerin yaklaşık yarısında saptanabildi.

Tüm grupların yaklaşık yarısında saptanan, miRNA-21'de gözlenen azalmalar diyabetik, DN ve MakAlb grupta kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (T2DM: 5 kat,  $p=0,004$ ; DN: 7,  $p=0,005$ ; NAlb: 4,  $p=0,519$  ve MikAlb: 5,  $p=0,559$ ; MakAlb: 7,  $p=0,005$ ). Tüm gruplardaki tüm bireylerde saptanan miRNA'lardan biri olan miRNA-192'de diyabetik hastaların tümünde 2 kat ( $p=0,029$ ), DN grubunda 2,4 kat ( $p=0,027$ ) azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. NAlb grubundaki 1,5 kat azalma ise anlamlı bulunmadı.

miRNA-29 ailesinde, -b'de kontrollere göre MikAlb'de azalma ve diğer gruplarında artma gözlemlendi. 1 kat olarak gözlenen bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. -a ve -c'de MikAlb gruptaki azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (sırasıyla, 2,5 ve 3 kat).

miRNA-126'da, tüm gruplardaki farklılıklar kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (T2DM: 1; NAlb: 1 kat artma; DN: 1,5, MikAlb: 1; MakAlb: 1,5 kat azalma).

miRNA-320c'de, gruplarda kontrollere göre gözlenen azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (T2DM: 2; DN: 2; NAlb: 2; MikAlb: 2, MakAlb: 1,5 kat).

miRNA-212'de, tüm gruplarda kontrollere göre gözlenen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (NAlb: 1; T2DM: 2 kata yakın artma; DN: 3; MikAlb: 5; MakAlb: 2 kat azalma).

Renal fonksiyon belirteçleriyle korelasyonlar incelendiğinde, sistatin C'ye göre eGFR ile miRNA-21, miRNA-192 ve miRNA-126 pozitif ilişki gösterdi (sırasıyla,  $r=0,262$ ,  $p=0,018$ ;  $r=0,203$ ,  $p=0,013$  ve  $r=0,417$ ,  $p=0,034$ ).

MDRD eGFR ile miRNA-21 ve miRNA-29c anlamlı korelasyon gösterdi (sırasıyla,  $r=0,243$ ,  $p=0,029$  ve  $r=0,188$ ,  $p=0,021$ )

CKD-EPI-Kreatinin ile yalnız miRNA-192'nin ilişkisi anlamlı bulundu ( $r=0,185$ ,  $p=0,023$ ).

GFR değerleri ile miRNA-29a, -b ve miRNA-212 anlamlı korelasyon göstermedi.

Mikroalbuminüri ile miRNA-21, miRNA-192, miRNA-29c ve miRNA-320 anlamlı negatif ilişki gösterdi (sırasıyla,  $r=-0,323$ ,  $p=0,003$ ;  $r=-0,267$ ,  $p=0,001$ ;  $r=-0,173$ ,  $p=0,034$  ve  $r=-0,172$ ,  $p=0,032$ ).

HbA1c ile miRNA-21 anlamlı negatif ilişki gösterdi ( $r=-0,274$ ,  $p=0,013$ ).

miRNA-21 ve miRNA-192'nin plazma düzeyleri DN'yi sağlıklı kişilerden ayırmadaki tanısal performansları istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla,  $AUC=0,726$ ,  $p=0,0001$  ve  $AUC=0,717$ ,  $p=0,0001$ ).

miRNA-21 için gruplardaki saptanma oranları düşük olmakla birlikte, GFR ve mikroalbuminüri ile ilişkileri dikkate alındığında, bulgularımız miRNA-21 ve miRNA-192'nin diyabetik nefropatiyle ilişkili miRNA'lardan olduğunu desteklemektedir. Azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da miRNA-29c DN tanısı açısından yararlı olabilir. miRNA-29c, miRNA-29b, miRNA-126, miRNA-212 ve miRNA-320c'nin DN ile ilişkilerinin belirlenmesi açısından daha çok araştırma gereklidir. miRNA-29a'nın ise DN ile ilişkisi desteklenmemektedir.

Posttranskripsiyonel etkili mikroRNA'ların, ilaç keşfi için biyobelirteç olarak terapötik amaçlı kullanılma durumlarına odaklanan araştırmaların yanı sıra plazma ve idrarda tanısal amaçlı da kullanılabilmeleri için daha çok sayıda araştırmaya ihtiyaç vardır

**Anahtar Kelimeler:** Diyabetik nefropati, mikroRNA, miRNA-21, miRNA-192

## ABSTRACT

### MicroRNAs in patients with type 2 diabetic nephropathy

Dr. Kadriye AKPINAR

Microribonucleic acids (microRNA/miRNA/miR-) are produced by cells of many tissues, and impact on the cells of many tissues. They have different roles in the development or prevention of various events, especially endothelial damage and fibrosis, and in disorders and diseases of organs such as the heart, liver, brain and kidney. Microalbuminuria, used in the diagnosis and follow-up of diabetic nephropathy (DN) which is an important public health issue, gives positive results only after renal damage develops. miRNAs are predicted to be useful in the early diagnosis of renal damage. In our study, we aimed to evaluate 10 miRNAs which were found to be related to diabetes in human (miRNA-21a-3p, miRNA-29a-3p, miRNA-29b-3p, miRNA-29c-3p, miRNA-126-3p, miRNA-192-5p and miRNA-320c), and in animal studies (miRNA-129-1-3p; miRNA-137, miRNA-212-3p.)

The study group was composed of 50 healthy controls (male: n=24; age: 55±11; women: n=26; age: 54±13) and 100 type 2 diabetic patients (male: n=46; age: 60 ± 11; female: n=54; age: 56±11). Diabetic patients were divided into three subgroups as normoalbuminuric (NAIb) (n=51), microalbuminuric (MicAlb) (n=25) and macroalbuminuric (MacAlb) (n=24) according to the urinary albumin levels. The diabetic group (T2DM) included 51 patients with NAIb and 49 patients with diabetic nephropathy (DN). Plasma miRNAs were analyzed by RT-PCR method. Serum fasting glucose, total cholesterol, triglycerides, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, cystatin C, creatinine, albumin; HbA1c, urinary albumin and creatinine in 24-hour urine were measured. Creatinine clearance was determined by collecting 24-hour urine. The glomerular filtration rates (eGFR) were estimated according to serum creatinine and serum cystatin C levels. The expression of each miRNA was compared between all diabetic groups and the control group, and the correlations of the expressions with the biochemical measurement results were evaluated.

Only miRNA-21 from the first 7 miRNAs investigated in humans were detected in half of the study group, others were detected in all individuals. miRNA-

129-1-3p and miRNA-137 studied in mouse were detected in a small number of the individuals, and were not evaluated because of lack of sufficient numbers. miRNA-212 could be detected in approximately half of all individuals.

The expressions of miRNA-21 which were detected in approximately half of all groups showed statistically significant decreases in the diabetic, DN and MacAlb groups than those in the controls (T2DM: 5-fold,  $p=0,004$ ; DN: 7,  $p=0,005$ ; NAlb: 4,  $p=0,519$ ; MicAlb: 5,  $p=0,559$ ; MacAlb: 7,  $p=0,005$ ). The decrease in the expression of miRNA-192, one of the miRNAs detected in all groups, was statistically significant in all diabetic patients (2-fold,  $p=0,029$ ) and in the DN group (2,4-fold,  $p=0,027$ ). A 1,5-fold decrease in NAlb group was not statistically significant.

In the miRNA-29 family, -b decreased in the MicAlb and increased in the other groups compared with the controls. These differences were approximately one fold and were not statistically significant. The decreases in -a and -c in the MicAlb group were not statistically significant (2,5 and 3-fold, respectively).

The differences of the expressions of miRNA-126 in all groups were not statistically significant (T2DM: 1; NAlb: 1-fold increase; DN: 1,5, MicAlb: 1; MacAlb: 1,5-fold decrease).

The decreases in miRNA-320c compared with the controls were not statistically significant. (T2DM: 2; DN: 2; NAlb: 2; MicAlb: 2; MacAlb: 1,5-fold).

The differences in miRNA-212 expressions that observed in all groups were not statistically significant when compared with the controls ( 1-fold in NAlb, and approximately 2-fold increase in T2DM; DN: 3; MicAlb: 5; MacAlb: 2-fold decreases).

Correlations of expressions with renal function markers examined. The eGFR based on cys C showed a positive correlation with miRNA-21, miRNA-192 and miRNA-126 ( $r=0,262$ ,  $p=0,018$ ;  $r=0,203$ ,  $p=0,013$  and  $r=0,417$ ,  $p=0,034$ , respectively).

miRNA-21 and miRNA-29c were significantly correlated with MDRD eGFR ( $r=0,243$ ,  $p=0,029$  and  $r=0,188$ ,  $p=0,021$ , respectively).



The correlation of CKD-EPI-creatinine with miRNA-192 was significant ( $r=0,185$ ,  $p=0,023$ ).

miRNA-29a, -b and miRNA-212 did not show significant correlation with eGFR values.

miRNA-21, miRNA-192, miRNA-29c and miRNA-320 were significantly negatively correlated with microalbuminuria ( $r=-0,323$ ,  $p=0,003$ ;  $r=-0,267$ ,  $p=0,001$ ;  $r=-0,173$ ,  $p=0,034$  and  $r=-0,172$ ,  $p=0,032$ , respectively).

HbA1c and miRNA-21 showed significant negative correlations ( $r= -0,274$ ,  $p=0,013$ ).

Plasma levels of miRNA-21 and miRNA-192 were found to be statistically significant in distinguishing the DN from healthy subjects (AUC=0,726,  $p=0,0001$  and AUC=0,717,  $p=0,0001$ , respectively).

Although we couldn't determined the expressions of miRNA in the whole group, our results supported that miRNA-21 and miRNA-192 could be related to diabetic nephropathy with respect to their correlations with the GFR and microalbuminuria. Our results for the expression of miRNA-29c can be helpful for monitoring the diabetes complications for DN, show that more research could be performed for prediction of DN. More research is needed to determine the association of miRNA-29c, miRNA-29b, miRNA-126, miRNA-212 and miRNA-320c with DN. The association of miRNA-29a with DN was not supported in our study.

**Key words:** Diabetic nephropathy, microRNA, miRNA-21, miRNA-192

## GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), akut ve kronik komplikasyonları sonucu ciddi tıbbi bakım, izlem ve maliyet gerektiren önemli bir halk sağlığı sorunudur (1).

DN diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından biri olup erişkin yaştaki diyabetli hastalarda en önemli morbidite ve mortalite nedenlerindedir. DN insidansı zamanla artmakta olup yaklaşık %9'dur. DN tip 1 diyabetli hastaların %30'unda, tip 2 diyabetli hastaların %10-40'ında görülür ve son dönem böbrek hastalığının (SDBH'in) önde gelen nedenlerindedir (%12-55) (2,3,4).

DN hipergliseminin indüklediği metabolik, hemodinamik ve inflamatuvar faktörler arasındaki etkileşimler sonucu görülür. Bu etkileşimler glomerüllerde fonksiyonel ve morfolojik değişikliklere yol açar (5).

DN göstergesi olarak albuminüri durumu değerlendirilir ve kreatinin, sistatin C gibi bazı testlerle tanı desteklenir. Ancak yapılan yeni çalışmalar bu testlerin diyabetik nefropati tanısını erken dönemde koymak için yeterli olmadığını göstermektedir. Bu yüzden erken dönem diyabetik nefropati tanısı koymak için yeni belirteçlere ihtiyaç vardır (6,7,8).

MikroRNA'lar, kısa ve kodlama yapmayan, yaklaşık 18-25 nükleotid uzunluğunda RNA molekülleridir. Bu moleküller özellikle gen ifadesinin transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzenleyicisi olarak görev alır. Hücre tipinin belirlenmesi, hücre farklılaşması, büyüme, gelişme, metabolizmanın düzenlenmesi gibi pek çok fizyolojik olayda ve anormal ifadesi sonucu pek çok patolojik durumda önem arz eder (9).

DN ile ilişkili pek çok miRNA bulunmasına rağmen henüz Türkiye'de DN ile ilişkili miRNA'lar üzerine yapılan yeterli çalışma mevcut değildir. Araştırma sonuçlarına göre; miRNA-21 ekspresyonunun azalması sonucu kollajen 1- $\alpha$ -1 ve kollajen 1- $\alpha$ -2 gibi hücre dışı matriks proteinlerin düzenleyicisi olan transforme edici büyüme faktörü  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ ) böbrek mezengiyal hücrelerinde arttığı yönündedir (10,11). miRNA-29 ailesi; miRNA-29a, miRNA-29b ve miRNA-29c'den oluşur. miRNA-29 ailesi, DN patogenezinde santral rol oynayan TGF- $\beta$ 'nın prosklerotik

etkilerini düzenler (12). miRNA-126 böbrek endotel hücrelerinde mevcut olup, anjiyogenezde önemli bir rol oynar ve DN'de azalması endotel hasarıyla ilişkilidir (7). Böbrekte yüksek oranda eksprese edilen miRNA-192 TGF- $\beta$  artışı sonrası kollajen birikimini artırır (13). Ancak ileri evre DN'li hastalarda yapılan bir diğer çalışmaya göre miRNA-192 ekspresyonu proksimal tübüler epitel hücrelerinde TGF- $\beta$  'ya yanıt olarak azalmıştır (14). Diyabetli hastalarda TGF- $\beta$ 1'i aktive eden trombospondin-1'in (TSP-1) ekspresyonu artar. DN'de ise TSP-1'i aracılığıyla TGF- $\beta$ 1 artışına sebep olan miRNA-320c ekspresyonu artar (15). Yapılan bazı fare deneylerine göre ise miRNA-129, miRNA-137 ve miRNA-212 düzeyleri diyabet hastalığında hepatik patoloji ve glukoz metabolizmasıyla ilişkili bulunup bu miRNA'ların DN ile ilgili olan ilişkileri henüz araştırılmamıştır (16).

Araştırmamızın amacı insanlarda DN ile ilişkisi bulunan miRNA-21a-3p, miRNA-29a-3p, miRNA-29b-3p, miRNA-29c-3p, miRNA-126-3p, miRNA-192-5p, miRNA-320c ve farelerde çalışılmış, diyabetle ilişkisi olduğu düşünülen miRNA-129-1-3p, miRNA-137, miRNA-212-3p ekspresyon düzeylerini sağlıklı, diyabetli ve DN'li hastalarda analiz ederek miRNA ekspresyon farklılıklarını değerlendirmek; böylece DN fizyopatolojisinin aydınlatılmasına katkıda bulunmak ve DN'de miRNA'ların gelecekte yeni bir erken tanı ve izlem belirteci olarak klinik laboratuvarlarda kullanılabilirliğini tartışmaktır.

## GENEL BİLGİLER

### DIABETES MELLITUS

#### **Tanım**

Diabetes Mellitus, insülinin salgılanmasında, etkisinde veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. Kronik hiperglisemi özellikle göz, böbrek, sinir, kalp ve kan damarları gibi çeşitli organların uzun süreli hasarı, disfonksiyonu ve yetmezliği ile ilişkilidir. Diyabetin gelişiminde pankreatik  $\beta$ -hücrelerinin otoimmün yıkımından, insülin eksikliğine ve bunun sonucunda insülin etkisine direnç gösteren anormalliklere kadar pek çok patojenik süreç mevcuttur. Diyabette karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki anormalliklerin temeli, hedef dokularda insülinin yetersiz etkisidir (17,18).

#### **Epidemiyoloji**

Dünya genelinde 2017 yılı itibariyle 20-79 yaş arası yetişkinlerin % 8,8'inin, yani yaklaşık 425 milyon insanın diyabet olduğu belirlenmiştir. 2045 yılına kadar bu sayının 629 milyon olacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de ise 2017 yılı itibariyle 10,1 milyon insanın diyabet olduğu ve 2045 yılına kadar bu sayının 13,3 milyon olacağı tahmin edilmektedir (19). Ülkemizde 2013 yılında yapılan epidemiyoloji çalışmasında diyabet prevalansı %16,5 bulunmuştur (20).

#### **Sınıflandırma**

Diabetes Mellitus 4 ana gruba ayrılmaktadır.

1. Tip 1 DM (Otoimmün  $\beta$ -hücre yıkımı nedeniyle, genellikle mutlak insülin eksikliği mevcuttur.)
2. Tip 2 DM (Sıklıkla insülin direnci zemininde ilerleyen  $\beta$ -hücrelerinden insülinin salgılanmasında bozukluk mevcuttur.)
3. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM) (Gebelik öncesi diyabet tanısı konmayıp, ikinci veya üçüncü trimesterde diyabet tanısı konulan diyabet türüdür.)

4. Diğer nedenlere bağlı özgül diyabet türleri, örneğin; monogenik diyabet sendromları (yenidoğan diyabeti ve gençlerde görülen *maturity-onset* diyabet [MODY] gibi), ekzokrin pankreas hastalıkları (kistik fibroz ve pankreatit gibi) ve ilaç veya kimyasal madde kaynaklı diyabet (HIV/AIDS tedavisinde veya organ nakli sonrası glukokortikoid kullanımı gibi) (2).

DM'nin etyolojik sınılandırılması Tablo 1'de ayrıntılı olarak gösterilmektedir (21).

### **Tip 1 Diabetes Mellitus**

Otoimmün ya da idiyopatik olarak ortaya çıkan Tip 1 Diabetes mellitus, pankreatik  $\beta$ -hücre kaybı nedeniyle insülin yetmezliği sonucu gelişir. Genellikle beta hücre yıkımına yol açan otoimmün süreçleri tanımlayan anti-glutamik asit dekarboksilaz, adacık hücresi veya insülin antikorlarının varlığı ile karakterize edilir. Sıklıkla çocukluk ve genç erişkinlerde görülür. Tip 1 diyabetik çocuklarda başlangıçta tipik olarak poliüri/ polidipsi ile ilgili belirtiler ve hastaların yaklaşık üçte birinde diyabetik ketoasidoz tablosu mevcuttur. Tip 1 diyabet erişkinlerde, çocuklarda görülen klasik belirtilerle birlikte olmayabilir. Başlangıçta tüm yaş gruplarında diyabet tipini ayırt etmede zorluklar ortaya çıksa da, tanı zaman içinde daha belirgin hale gelir. Tip 1 diyabet hastalarının tedavisinde normogliseminin sağlanması için ekzojen insülin kullanılır (2,22).

### **Tip 2 Diabetes Mellitus**

Tip 2 diyabet tüm diyabet hastalarının % 80-90'ını oluşturur. Hastalarda pankreatik  $\beta$ -hücresinin işlevindeki bozukluk nedeniyle insülin salgılanmasında ve insülin direnci nedeniyle insülinin etkisinde bozukluk mevcuttur (2,22). İnsülin direnci, dokuların insülin aracılı glukoz kullanımının azalması ve karaciğer glukozun yapımının artması şeklinde ortaya çıkan metabolik bozukluktur. İnsülin direnci yağ ve protein metabolizması, kas-iskelet sistemi, adipoz doku, üreme sistemi, bağışıklık sistemi ve santral sinir sistemi gibi pekçok sistemi etkiler (23).

Ağız kuruluğu, polifaji, polidipsi, poliüri, kilo kaybı, bulanık görme, ayaklarda uyuşma, karıncalanma, yanma, idrar yolu enfeksiyonları, vulvovajinit, mantar enfeksiyonları, kaşıntı, ciltte kuruma, yorgunluk gibi genel diyabet belirtilerinin

**Tablo 1.** Diabetes Mellitus'un etyolojik sınıflandırılması (21)

---

<b>1. T1DM</b>	-Feokromasitoma
Genellikle mutlak insülin eksikliğine	-Hipertiroidi
yol açan hücre yıkımı vardır.	-Somatostatinoma
<b>2. T2DM</b>	-Aldosteronoma
İnsülin direnci, göreceli insülin yetmezliği,	-Diğerleri
veya insülin direnci zemininde ilerleyici insülin	E.İlaç ve Kimyasal Maddelerle
salınım defekti vardır.	Oluşan Diyabet
<b>3. Diğer Özgül Tipler</b>	-Vakor
A.Beta Hücre Fonksiyonunun Genetik Defektleri	-Pentamidin
-MODY (Görülme sıklığına göre sıralanmıştır.)	-Nikotinic asit
HNF-1 (MODY 3)	-Glukokortikoidler
Glukokinaz enzim eksikliği (MODY 2)	-Tiroid
HNF-4 (MODY 1)	-Diazoksid
IPF-1 (MODY 4)	-β-adrenerjik agonistler
HNF-1 (MODY 5)	-Tiazid diüretikler
NeuroD1 (MODY 6)	-Antipsikotik ilaçlar
-Mitokondrial DNA	-Dilantin
-Diğerleri	-γ-interferon
B.İnsülin Etkisinin Genetik Defektleri	-Diğerleri
-Tip A insülin direnci	F.Enfeksiyonlar
-Leprechaunism	-Konjenital kızamıkçık
-Rabson-Mendenhall Sendromu	-Sitomegalovirus
-Lipoatrofik diyabet	-Diğerleri
-Diğerleri	G. İmmün ilişkili Diyabetin
C.Ekzokrin Pankreas Hastalıkları	Sık Olmayan Formları
-Pankreatit	- "Stiff-man" Sendromu
-Travma/pankreotektomi	-Antiinsülin reseptör antikoru
-Neoplazi	-Diğerleri
-Kistik Fibrozis	H.Diyabetle Birlikte Görülebilen
-Hemokromatozis	Diğer Genetik Sendromlar
-Fibrokalkülöz pankreatopati	-Down Sendromu
-Diğerleri	-Klinefelter Sendromu
D.Endokrinopatiler	-Turner Sendromu
-Akromegali	-Wolfram Sendromu
-Cushing Sendromu	
-Glukagonoma	<b>4. Gestasyonel DM</b>

---

yanısıra hastalarının çoğunluğu komplikasyonların gelişimiyle ya da rastlantısal olarak diyabet tanısı alır (22,24). Diyabetli bazı kişilerde kilo verme, egzersiz ve farmakolojik tedavi ile yeterli glisemik kontrol sağlanabilir. Bir miktar insülin sekresyonu olan ancak yeterli glisemik kontrolün sağlanamadığı veya  $\beta$ -hücre yıkımı olup insülinin salgılanmadığı kişilerde ise ekzojen insülin kullanılır (25).

### Diabetes Mellitus'un Tanısı

Diabetes Mellitus'un tanısında Tablo 2'deki kriterler kullanılmaktadır (2,21).

**Tablo 2.** Diabetes Mellitus'un tanı kriterleri (2,21)

Aşağıdaki kriterlerden sadece biri tanı için yeterlidir.

<b>1.Açlık Plazma Glukozu</b> <sup>1,2,3</sup>	$\geq 126$ mg/dL (7,0 mmol/L)
<b>2.Rastlantısal Plazma Glukozu</b> <sup>3,4</sup> <b>+ diyabet belirtileri</b>	$\geq 200$ mg/dL (11,1 mmol/L)
<b>3.Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)'nde 2. saat plazma glukozu</b> <sup>3,5,6</sup>	$\geq 200$ mg/dL (11,1 mmol/L)
<b>4.HbA1c</b> <sup>3,7,8</sup>	$\geq \%6,5$ (48 mmol/mol)

<sup>1</sup>Kan glukozu ölçümünde referans yöntem olarak venöz plazmada glukoz oksidaz yöntemi kullanılmalıdır.

<sup>2</sup>Açlık plazma glukozu için en az 8 saat açlık gereklidir.

<sup>3</sup>Kesin olmayan hiperglisemi yokluğunda, sonuçlar tekrar testiyle doğrulanmalıdır.

<sup>4</sup>Rastlantısal plazma glukozu, gıda alımına bağlı olmaksızın günün herhangi bir saatinde ölçülebilir.

<sup>5</sup>OGTT 75 g oral glukoz alımı ile yapılmalıdır.

<sup>6</sup>Plazma glukoz ölçümüne göre tam kan glukoz ölçümü %11, kapiller glukoz ölçümü %7, serum glukoz değeri %5 civarında daha düşük bulunur.

<sup>7</sup>HbA1c testi, Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP) sertifikalı ve Diyabet Kontrolü ve Komplikasyonları Çalışması'na (DCCT) göre standardize edilmiş metod kullanan bir laboratuvarında ölçüm yapıldığında tanı testi olarak kullanılabilir. Ülkemizde henüz HbA1c ölçüm testleri standardize edilemediği için tek başına tanı testi olarak kullanılması önerilmez.

<sup>8</sup>HbA1c testi anemi, hemoglobinopati, gebelik varlığında, C ve E vitamini gibi antioksidan kullanımında tanı testi olarak kullanılamaz.

<sup>9</sup>Diyabet tanısında kullanılan OGTT ve HbA1c'nin tanı değeri olarak birbirine göre üstünlüğü yoktur.

## Diabetes Mellitus'un Tanı ve İzleminde Kullanılan Testler

### *Glukoz Temelli Testler*

Diyabet hiperglisemi ile karakterizedir; bu nedenle glukoz ölçümü diyabetin tanı ve izleminde esas testtir (2,26). Hiperglisemi diyabet tanısı kriterlerini karşılamadan bozulmuş açlık glukozu (IFG) ve/veya bozulmuş glukoz toleransına (IGT) neden olabilir. Prediyabet (diyabet için artmış risk) tanı kriterleri Tablo 3'te gösterilmektedir (2,22).

**Tablo 3.** Prediyabet tanı kriterleri (2,22)

<b>Riskli Grup</b>	<b>Açlık Plazma Glukozu</b>	<b>OGTT'de 2.saat Plazma Glukozu</b>
<b>Bozulmuş Açlık Glukozu (IFG)</b>	100-125 mg/dL (5,6-6,9 mmol/L)	
<b>Bozulmuş Glukoz Toleransı (IGT)</b>		140-199 mg/dL (7,8-11,0 mmol/L)
<b>HbA1c</b>	%5,7-6,4 (39-46 mmol/mol)	

Kan glukozu tam kan, plazma veya serumda ölçülebilir ancak tanıda venöz plazma önerilir. Açlık kan glukozu sabahları ve 8 saatlik açlık sonrası alınmalıdır. Glikolizi azaltmak için örnek buzda hızla getirilmeli ve 30 dk içinde plazma elde edilmelidir. Eğer bu mümkün değilse sitrat tamponu içeren tüpler kullanılabilir. Glukoz analizinde enzimatik yöntemler göreceli olarak iyi standardize edilmiştir (27).

Şeker yükleme testinde (OGTT) hasta en az 8 saat açlık sonrası, 75 g anhidroz glukozu 250-300 mL suyun içinde çözdürdükten sonra 5 dakika içinde içmelidir. İçmeden önce (0.saat) ve 2. saat kan glukoz değerleri ölçülmelidir (28).

### *Ketonlar*

Diyabetli hastalarda karbohidratların kullanımının azalması ile keton cisimciklerinin oluşumu artar (29). Diyabetik ketoasidozun hem tanısı hem de takibi



için diyabetli hastalarda idrar ve kandaki ketonların ölçümü yaygın olarak yapılır. İdrarda keton ölçümü özellikle tip 1 diyabetliler, önceden diyabeti olan gebeler ve GDM olan hastaların izlenmesinde önemlidir (30).

### ***Glike Hemoglobin (HbA1c)***

Monosakkaridlerin (glukozun veya fruktozun) proteinlerdeki serbest  $-NH_2$  grubu ile kendiliğinden (nonenzimatik) reaksiyona girmesine glikasyon denir. Diyabet hastalarında artmış kan glukozu nedeniyle glike hemoglobin artar. Glukozun  $\beta$ -zincirlerinin N-terminal grupları ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan glike hemoglobine HbA1c denir. HbA1c en yaygın bulunan glike hemoglobindir ve ölçüm gününden en az 8-10 hafta öncesinde başlamış olan hiperglisemiye yansıtır (29,31).

HbA1c diyabet tanısı ve tedavisi, diyabet hastalarının bakım kalitesini değerlendirmek ve diyabet komplikasyonlarının gelişmesi ve ilerlemesinde oluşan riskleri öngörmek için kullanılır (2,32,33).

HbA1c glisemik kontrolün bir önceki bir sonuca göre iyileşip iyileşmediğini ve hastanın HbA1c hedefine ne kadar yakın olduğunu gösterir. Bu nedenle, en uygun klinik kullanım için, analitik performansın belirlenmesinde referansa göre bias ve belirsizlik (*imprecision*) dikkate alınmalıdır. HbA1c'nin HPLC yöntemi ile ölçümünde analitik belirsizlik  $\leq\%2,9$ , bias  $\leq\%2,2$  ve toplam hata  $\leq\%6,9$  olmalıdır (2,32,34,35).

### ***Lipitler***

Tip 2 diyabet hastalarında en sık görülen lipit profili yüksek trigliserit, düşük HDL kolesterol ve yüksek ya da nispeten normal LDL kolesterol düzeylerinden oluşur (2,36). Tip 2 diyabetli hastalarda anormal lipit profili, diyabetik nefropatinin gelişmesi, ilerlemesi ve kardiyovasküler mortalite için geri dönüşlü bir risk faktörüdür (37).

Amerikan Diyabet Derneği'ne (ADA) göre diyabetli erişkinlerde tanı anında, başlangıç tedavisinde ve en az yılda bir kez açlık ( $>8$  saat) lipit profili istenmelidir. Lipit değerleri düşük riskli [LDL kolesterol  $<100$  mg/dL ( $<2,6$  mmol/L), HDL kolesterol  $<50$  mg/dL (1,3mmol/L) ve trigliseritler  $<150$  mg/dL (1,7 mmol/L)] olan erişkinlerde lipit profili her 2 yılda bir tekrarlanabilir (25). Kanada Diyabet

Birliği'nin önerisine göre ise hastalardan açlık durumuna bakılmaksızın lipit profili rutin beş yılda bir, kardiyovasküler riski olanlarda ve uzun süredir diyabet olanlarda daha sık ölçülebilir. Trigliserit düzeyi > 400mg/dL (4,5 mmol/L) olanlardan açlık (> 8 saat) lipit profili istenmelidir (36).

### ***İdrarda Albumin (Mikroalbuminüri)***

İdrarda albumin atılımı diyabetik nefropati ve kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörüdür. İdrarda albumin miktarının tayini böbrek hastalığının saptanması, tanının doğrulanması, tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi ve prognozu belirlemede önemli bir rol alır (27,38).

İdrarda albumin atılımı taraması, albumin/kreatinin oranının ölçülmesi, 24 saatlik idrarda albumin ölçümü veya belirli bir zaman aralığında idrarda albumin ölçümü şeklinde olabilir. Albumin atılım anormallikleri ile idrarda albumin/kreatinin oranları, 24 saatlik albumin atılımı, süreli idrar albumini arasındaki ilişki Tablo 4'te verilmektedir (25,39-41).

**Tablo 4.** Albumin atılımındaki anormalliklerin tanımları (10,24-26)

	<b>Normal</b>	<b>Mikroalbuminüri</b>	<b>Makroalbuminüri</b>
<b>24 saatlik idrar albumini (mg/24saat)</b>	<30	30–299	≥300
<b>Spot idrar albumini* (mg/g kreatinin)</b>	<30	30–299	≥300
<b>Süreli idrar albumini (µg/dk)</b>	<20	20–199	≥200

*\*İdrar albumin atılımındaki değişkenlikten dolayı diyabetik hastada 3-6 aylık bir süre içinde toplanan üç örnekten ikisinde artmış albumin atılımı hastada nefropati geliştiği ya da nefropatinin ilerlediği anlamına gelir.*

### ***Hesaplanan Glomerüler Filtrasyon Hızı (eGFR)***

Glomerüler filtrasyon hızı (GFR) böbrek glomerüllerinden serbestçe filtre edilen maddelerin dakikadaki mililitre cinsinden filtrasyon hızıdır (42). Diyabetik nefropatinin derecelendirilmesinde GFR en iyi gösterge olarak kabul edilir (43). Kreatinin ve sistatin C GFR hesaplanmasında kullanılan endojen belirteçlerdendir

(44). GFR için en yaygın kullanılan en iyi değerlendirme yöntemi kreatinin klirensidir. Ancak pahalı ve zaman alıcı olması nedeniyle serum kreatininine dayalı cinsiyet, vücut alanı, ırk gibi özellikler dikkate alınarak pek çok denklem kullanılmaya başlanmıştır (45-49). ADA'ya göre diyabetik nefropatili hastalarda GFR'nın değerlendirilmesinde kreatinin temelli eGFR, *The Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) veya *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) formülleriyle hesaplanarak kullanılabilir (25).

Sistatin C, endojen sistein proteinaz inhibitörü olan düşük moleküler ağırlıklı bir proteindir ve GFR ile yüksek düzeyde korelasyon gösterir. Bu korelasyon inflamatuvar durumlardan, kas kütesinden, cinsiyetten, vücut kompozisyonundan ve yaştan (12 aylıktan sonra) bağımsızdır. Kreatininin aksine tübüler salgılanması olmaz. Serum ve idrar sistatin C düzeyleri tip 2 nefropatik diyabetlilerde daha yüksek bulunur. Kronik böbrek hastalığında sistatin C'nin GFR'nın bir göstergesi olarak kreatininden daha iyi performans gösterdiği ile ilgili pekçok çalışma mevcuttur ve özellikle eGFR <60 mL/dk/1.73m<sup>2</sup> olanlarda, diyabetik çocuklarda, kas kütesindeki değişiklik durumlarında, karaciğer hastalığı olanlarda, yaşlarda diğer belirteçlerden daha üstündür (47,50-52).

Tip 2 diyabetli hastalarda ve komorbid hipertansiyonu olan hastalarda ve 5 yıldan fazla süredir tip 1 diyabeti olan hastalarda yılda en az bir kez idrar albumini ve eGFR değerlendirilmelidir. GFR değerlendirilmesinde kullanılan denklemler Tablo 5'te gösterilmektedir (53,54).

### **DIABETES MELLITUS'UN KOMPLİKASYONLARI**

Kontrolsüz diyabette kalıcı hiperglisemi, hem akut hem de kronik komplikasyonlara neden olabilir (55). DM'nin komplikasyonları Tablo 6'da özetlenmektedir (22).

**Tablo 5.** GFR değeriendirilmesinde kullanılan bazı denklemler (53,54)

**Kreatinin Klirensi (mL/dk)** = [İdrar kreatinini (μmol/L) × 24 saatlik idrar hacmi (L)] / [Serum kreatinini (μmol/L) × 1440] (*SI birim*)

**Kreatinin Klirensi (mL/dk)** = [İdrar kreatinini (mg/dL) × 24 saatlik idrar hacmi (mL)] / [Serum kreatinini (mg/dL) × 1440] (*Konvansiyonel birim*)

**MDRD eGFR (mL/dk/1,73 m<sup>2</sup>)** = 175 × (Serum kreatinin / 88,4)<sup>-1,154</sup> × (Yaş)<sup>-0,203</sup> × (0,742 Kadınsa) × (1,212 Afrikalıysa) (*SI birimi*)

**MDRD eGFR (mL/dk/1,73 m<sup>2</sup>)** = 175 × (Serum kreatinin)<sup>-1,154</sup> × (Yaş)<sup>-0,203</sup> × (0,742 Kadınsa) × (1,212 Afrikalıysa) (*Konvansiyonel birim*)

**2009 CKD-EPI kreatinin eGFR (mL/dk/1,73 m<sup>2</sup>)** = 141 × min. (Serum kreatinin/κ ya da 1)<sup>α</sup> × maks. (Serum kreatinin / κ ya da 1)<sup>-1,209</sup> × 0,993<sup>Yaş</sup> × 1,018 (Kadınsa) × 1,159 (Siyah ırksa) (*SI birimi*)

*Serum kreatinin birimi μmol/L'dir.*

*κ, kadınlarda 61,9 erkeklerde 79,6 alınmalıdır.*

*α, kadınlarda -0,329 erkeklerde -0,411 alınmalıdır.*

*Min., en düşük serum kreatinin/κ ya da 1 anlamına gelir.*

*Maks., en yüksek serum kreatinin/κ ya da 1 anlamına gelir.*

**2009 CKD-EPI kreatinin eGFR (mL/dk/1,73 m<sup>2</sup>)** = 141 × min. (Serum kreatinin / κ ya da 1)<sup>α</sup> × maks. (Serum kreatinin/κ ya da 1)<sup>-1,209</sup> × 0,993<sup>Yaş</sup> × 1,018 (Kadınsa) × 1,159 (Siyah ırksa) (*Konvansiyonel birim*)

*Serum kreatinin birimi mg/dL'dir.*

*κ, kadınlarda 0,7 erkeklerde 0,9 alınmalıdır.*

*α, kadınlarda -0,329 erkeklerde -0,411 alınmalıdır.*

*Min., en düşük serum kreatinin/κ ya da 1 anlamına gelir.*

*Maks., en yüksek serum kreatinin/κ ya da 1 anlamına gelir.*

**2012 CKD-EPI sistatin C (mL/dk/1,73 m<sup>2</sup>) eGFR=133 × min. (Serum sistatin C / 0,8 ya da 1)<sup>-0,499</sup> × maks. (Sistatin C / 0,8 ya da 1)<sup>-1,328</sup> × 0,996<sup>Yaş</sup> (Kadınsa 0,932)**

*Serum sistatin C birimi mg/L'dir.*

*Min., en düşük sistatin C/0,8 ya da 1 değeri anlamına gelir.*

*Maks., en yüksek sistatin C/0,8 ya da 1 değeri anlamına gelir.*

**Tablo 6.** Diabetes Mellitus'un komplikasyonları (22)

---

**1. Akut Komplikasyonlar**

A.Hipoglisemi

B.Hiperglisemik Ataklar

-Diyabetik Ketoasidoz

-Hiperglisemik hiperozmolar durum

**2.Kronik Komplikasyonlar**

A.Mikrovasküler Komplikasyonlar

-Diyabetik nefropati

-Diyabetik retinopati

-Diyabetik nöropati

B.Makrovasküler komplikasyonlar

-Aterosklerotik kalp hastalığı

-Periferel vasküler hastalık

-Serebrovasküler hastalık

**3.Diğer Komplikasyonlar**

A.Büyüme ve gelişme geriliği

B.Otoimmün durumlar

-Hipotiroidi

-Hipertiroidi

-Çölyak hastalığı

-Vitiligo

-Primer Adrenal Yetmezliği (Addison Hastalığı)

C.Lipodistrofi (Lipoatrofi ve lipohipertrofi)

D.Nekrobiyozis lipoidika diabetikorum

E.Non-alkolik karaciğer hastalığı

F.Diyabette görülen enfeksiyonlar

G.Eklem hareket kısıtlılığı

H.Ödem

---

## **Diyabetik Nefropati**

Diyabetik nefropati veya diyabetik böbrek hastalığı, diyabet hastalarında idrar albumin atılımının artışı, glomerüler lezyonların varlığı ve GFR'nın kaybı ile karakterize patolojik klinik bir sendromdur (56,57).

DN insidansı zamanla artmakta olup yaklaşık %9'dur. DN tip 1 diyabetli hastaların %30'unda, tip 2 diyabetli hastaların %10-40'ında görülür ve SDBH'in önde gelen nedenidir (%12-55) (1,2,4).

Hem diyabetin hem de DN'nin erken tanısının konulamaması bu hastalıkların önlenmesini engeller. Diyabetik ve diyabetik nefropatili hastaların yetersiz veya uygunsuz tedavileri ise nefropatinin ilerlemesine neden olur. Ancak bu durum, yakın diyabet takibi ve albuminürik hastalarda anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri, anjiyotensin reseptör blokörleri (ARB) ve statinlerin kullanımı ile nispeten düzeltilebilir (2,3,38). İyi glisemik kontrolün sağlanamadığı durumlar sık hastaneye yatış ve erken ölümle sonuçlanabilir. Sonuçta diyabetli kişiler, tıbbi bakım maliyetlerini arttıran ve yaşam kalitesini düşüren, yaşamı tehdit eden ciddi sağlık problemleri geliştirme riskini artırır (1).

### ***Diyabetik Nefropatinin Patofizyolojisi***

Diyabetik nefropati ve sonuçta ortaya çıkan SDBH'nin gelişmesine yol açan patofizyoloji, hiperglisemi sonucu ileri glikasyon son ürünlerinin üretilmesi ve dolaşıma verilmesi, büyüme faktörlerinin artması ve hemodinamik ve hormonal değişikliklerin ortaya çıkması şeklindedir. Bu durum reaktif oksijen türlerinin ve inflamatuvar mediatörlerin salınmasına yol açar. Bu değişikliklerin toplam etkisi sonucu glomerüler hiperfiltrasyon, glomerüler hipertansiyon, renal hipertrofi görülür ve glomerüllerin yapısı ve içeriği değişir. Bu durum hastanın kliniğine albuminüri ve hipertansiyon şeklinde yansır. Böbrekler, hücre dışı matriksin birikmesi, glomerüler bazal membran kalınlaşması, proliferatif değişiklikler ve tübüler atrofi dahil olmak üzere birçok değişikliğe uğrarlar, sonuçta interstisyel fibrozis ve glomerüloskleroz ile sonuçlanır (5,40,58-60).

Diyabetik nefropatide albuminüri yavaş ve progresif bir şekilde artar. Uzun süredir diyabet hastası olmak, kötü glisemik kontrol, kötü kontrollü kan basıncı, yüksek lipit değerleri, obezite ve sigara kullanımı bu ilerleyişi artıran ve hızlandıran faktörlerdir (36).

### ***Diyabetik Nefropatinin Evrelendirilmesi ve Takibi***

Diyabetik nefropati 5 evrede tanımlanmıştır (57,61).

Evre 1 (Hiperfiltrasyon-Hipertrofi): Böbrek hipertrofisi ve hiperfiltrasyonu vardır. GFR %20-40 artabilir. Glomerüler bazal membranda hafif kalınlaşma mevcuttur.

Evre 2 (Sessiz Dönem): GFR hala yüksektir ve hiperfiltrasyon devam eder, ancak zamanla azalarak normale döner. Kan basıncı ve idrar albumin atılımı normal sınırlarda seyreder. Bazal membranda nonspesifik kalınlaşma mevcuttur. İyi glisemik kontrol ile çoğu hasta bu evrede kalır.

Evre 3 (Mikroalbuminüri): Mikroalbuminüri vardır. İdrarda albumin atılım hızı 20-200 µg/dk veya 30-300mg/24saat'tir. Diyabetin başlangıcından itibaren 6-15 yıl sonra başlar. Kan basıncı da hafif yükselir. GFR yüksek veya normal olabilmekle birlikte daha az sıklıkta düşme gözlenir. İyi glisemik kontrol, protein kısıtlaması (<0,8 g/kg/gün) ve antihipertansifler (özellikle ACE inhibitörleri ve ARB'ler) ile idrarda albumin atılımı azaltılabilir.

Evre 4 (Aşık Nefropati): Makroalbuminüri vardır. İdrarda albumin atılımı >300 mg/24 saat veya >20 µg/dk'dır. Bu evre diyabet hastalarında 10-25 yıl sonra görülür. Histolojik değişiklikler belirgindir ve hipertansiyon yerleşmiştir. GFR'deki azalma kan basıncı düzeyi ile koreledir. Glomerüllerde skleroz da görülür.

Evre 5 (Son Dönem Böbrek Hastalığı): Bu dönemde böbrek yetmezliği gelişir. Bu evre diyabet hastalarında 10-30 yıl sonra görülür. Ağır hipertansiyon, kreatinin yüksekliği, üremi, ödem görülür. Tedaviye yönelik olarak hemodiyaliz önerilebilir.

Diyabetik nefropatinin değerlendirilmesinde albuminüri ve eGFR kullanılır. Kronik böbrek hastalığında üç-6 aylık periyod içerisinde yapılan üç tetkikten iki veya daha fazlasında persistan albuminüri >300 mg/24 saat veya >20 µg/dk mevcut olup, genellikle eGFR <60 mL/dk/1,73m<sup>2</sup> altındadır Kronik böbrek hastalığının prognozunun eGFR ve mikroalbuminüriye göre sınıflandırılması Tablo 7'de gösterilmektedir (62,63).

Diyabetik nefropatinin göstergesi olarak eGFR ve albuminüri durumu değerlendirilmesinin yanısıra kreatinin, böbrek enzimleri, sistatin C, C-reaktif protein (CRP) gibi bazı testlerle tanı desteklenir. Ancak yapılan yeni çalışmalar bunun diyabetik nefropati tanısını erken dönemde koymak için yeterli olmadığını göstermektedir. Bu yüzden erken dönem diyabetik nefropati tanısı koymak için yeni belirteçlere ihtiyaç vardır (64-67).

**Tablo 7.** Kronik böbrek hastalığı prognozunun eGFR ve mikroalbuminüriye göre sınıflandırılması (54,63)

				Persistan Albuminüri		
				A1	A2	A3
				Normoalbuminüri	Mikroalbuminüri	Makroalbuminüri
eGFR(mL/dk/1,73 m <sup>2</sup> )	G1	Normal ya da yüksek	≥90			
	G2	Hafif azalma	60-89			
	G3a	Hafif-orta azalma	45-59			
	G3b	Orta-ağır azalma	30-44			
	G4	Ağır azalma	15-29			
	G5	Böbrek yetmezliği	<15			

\*Yeşil Düşük risk (böbrek hastalığının başka belirteçleri yoksa KBH yok); sarı: orta derecede artmış risk; turuncu: yüksek risk; kırmızı: çok yüksek risk.

## MİKORNA'LAR (miRNA'LAR)

### miRNA'ların Tarihçesi

1993 yılında Victor Ambros ve Gary Ruvkun tarafından *Caenorhabditis elegans* (C. elegans) denilen bir nematodta lin-14 geninin negatif düzenleyicisi olarak lin-4 adındaki ilk miRNA keşfedilmiştir (68). 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları C. elegans'ın gelişimsel basamaklarında görevli let-7 adı verilen bir diğer miRNA'yı bulmuştur (69). Let-7'nin türler arasında korunmasının keşfi ile devrim niteliğinde görülen, yaklaşık 22 nükleotidlik kısa kodlanmayan RNA sınıfında yer



alan ve gen ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu bu RNA'lara mikroRNA'lar adı verilmiştir (70).

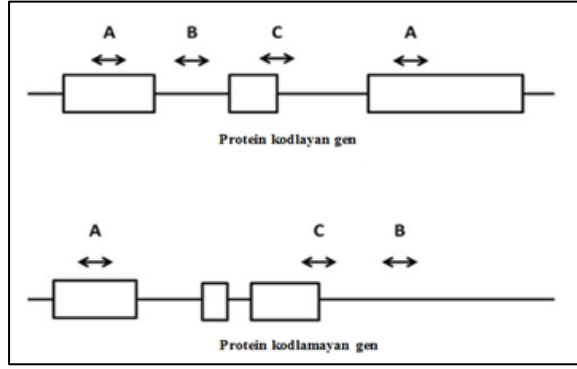
Günümüzde insan ve diğer türlerde binlerce miRNA tanımlanmıştır ve bu verilere miRBase (<http://www.mirbase.org>) gibi online sekans depolarından erişmek mümkündür. Ayrıca, miRNA olası hedeflerine ilişkin geliştirilen güncel araç ve yazılımlar miRNA'ların fonksiyonel yollar ile ilgili çalışmalarına yardımcı olmaktadır (71).

### **miRNA'ların İsimlendirilmesi**

miRNA'ların isimlendirilmesi üç bölümden oluşmaktadır. İlk bölüm, türlere atıfta bulunan üç karakterden oluşmaktadır (örn: *hsa-H. sapiens*, *cel-C. elegans*, *mmu-M. musculus*), (Bu çalışmada yer alan mikroRNA'ların tamamı insanda mevcut olup bundan sonraki bölümlerde "hsa" öneki kullanılmayacaktır.). İkincisi evrensel "-miR-" bölümüdür. Son bölüm, sadece miRNA dizisi anlamına gelen sayıdır. Eğer özdeş sekanslara sahip olan iki miRNA, genomun farklı gen lokuslarından transkripsiyon, tirden sonra ikinci bir sayı (örn: miR-92-1, miR-92-2) gelir. İki miRNA sadece bir veya iki nükleotidde farklılık gösteriyorsa, ilk sayıdan sonra bir karakter alırlar (örn: miR-200a, miR-200b). Bazı prekürsör miRNA'lar iki farklı şekilde bölünebilir ve eğer bölünme miRNA öncülünün 5' veya 3' ucuna yakın bir yerde gerçekleşirse, miRNA'nın sayısından sonra -5p veya -3p ile işaretlenir (örneğin: miR-483-3p, miR-483-5p) (72).

### **miRNA Genleri**

miRNA'lar 18-25 nükleotid uzunluğunda, gen ifadesinin transkripsiyonel ve post transkripsiyonel düzenleyicisi olarak işlev yapan kısa kodlanmayan RNA'lardır (73). miRNA genleri, Y kromozomu hariç tüm kromozomlarda, hem protein kodlayan hem de kodlamayan transkripsiyon bölgelerinde yer alır. miRNA genleri intron ve/veya eksonlarda gen içi (her ikisinde mevcutsa bu genler 'mixed' miRNA genleri olarak adlandırılır) ve genler arası bölgelerde bulunabilir. miRNA genlerinin genomdaki yerleşimi Şekil 1'de gösterilmektedir (72).

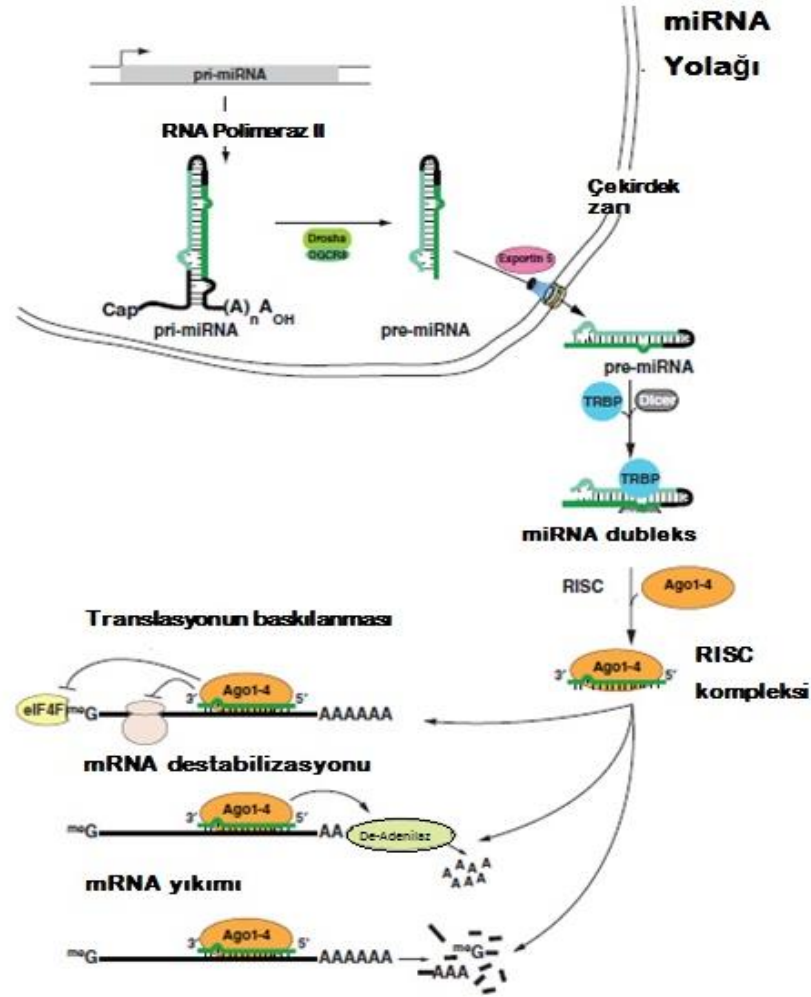


**Şekil 1.** miRNA genlerinin yerleşimi: **A:** İntronik, **B:** Ekzonik, **C:** Protein kodlayan ve kodlamayan genlerdeki ‘mixed’ yerleşim (72)

### miRNA’ların Biyogenezi

miRNA’ların sentezi miRNA genlerinden RNA polimeraz II (RNA pol II) enzimi aracılığıyla >1000 nt uzunluğunda olan primer miRNA (pri-miRNA) sentezlenmesiyle başlar. Pri-miRNA’ların 5’ ucunda 7 metilguanozin başlığı ve 3’ ucunda poli A kuyruğu yer alır. Tek zincirden oluşan pri-miRNA’lar kendi üzerinde kıvrılarak saç tokası (*hairpin*) yapısını oluşturur. pri-miRNA nükleusta bulunan bir RNaz olan Drosha ve RNA bağlanma noktası bulunan bir protein olan DGCR8/Pasha’dan oluşan mikroişlemci komplekse bağlanır ve 60-70 nükleotidlik parçalar haline getirilerek kök halka (*stem-loop*) şeklindeki prekürsör miRNA (pre-miRNA) haline dönüştürülür. pre-miRNA Ran-GTP bağımlı olarak Exportin 5 (XPO5) tarafından sitoplazmaya taşınır (74,75). Sitoplazmaya geçen pre-miRNA RNA polimeraz III’ün bir türü olan Dicer endonükleazı ve RNA bağlayıcı proteinlerden TRBP [*transactivation-responsive (TAR) RNA binding protein*] proteininin oluşturduğu kompleks tarafından kesilerek 20-25 nükleotidlik çift sarmallı olgun miRNA halini alır (76). Daha sonra helikaz tarafından çözülerek olgun miRNA’ya dönüşür. Olgun miRNA, 4 argonaute proteinlerinden biri (1-4) ile RISC (*RNA-induced silencing complex*) olarak tanımlanan RNA ile uyarılmış susturma kompleksini oluştururlar (74). miRNA’yı içeren RISC, mRNA (mesajcı RNA)’yı hedefleme yeteneğine sahiptir. Hedef seçiminde “çekirdek-seed” adı verilen bölge mRNA’ya bağlanmayı sağlayan kısımdır. Bununla birlikte, miRNA ya da mRNA’lara bağlanan proteinler de hedef seçimini etkiler (77). RISC içindeki miRNA’lar hedef mRNA’nın 3’UTR, 5’UTR, ORF bölgelerine ya da promotör

bölgelerine baz eşleşmesine göre bağlanarak translasyonu ya mRNA'yı baskılayarak ya da mRNA'yı parçalayarak engeller (78). miRNA'lar, mRNA'ların 3'UTR bölgesine yüksek oranda komplementerlik gösterirse mRNA degrade olur. Ancak komplementerlik azaldıkça mRNA'nın translasyonu baskılanır. Genel olarak miRNA'lar post transkripsiyonel düzenlenmeyi; translasyonu baskılayarak veya mRNA hedeflerinin yıkımını sağlayarak yapar<sup>79</sup>. miRNA'ların biyogenezini Şekil 2'de gösterilmektedir (74).



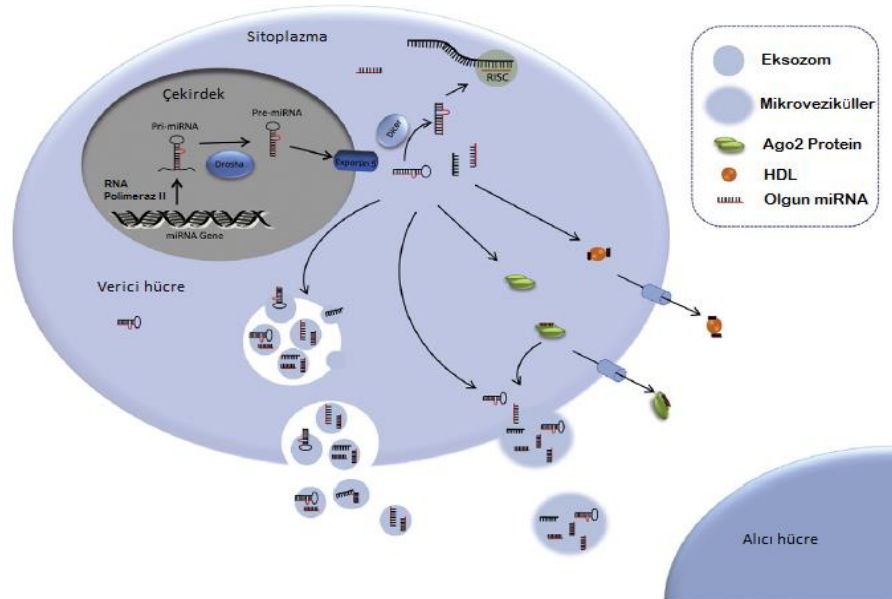
Şekil 2. miRNA'ların biyogenezini (74)

### miRNA'ların Salınımı

miRNA'ların çoğunluğu hücrelerde bulunurken, hücre dışı miRNA olarak bilinen pekçok miRNA, farklı biyolojik sıvılar ve hücre kültür ortamı dahil olmak üzere hücre dışı ortamda da tespit edilmiştir. İnsan vücudunda miRNA'lar tam kan,

serum veya plazmanın yanısıra tükürük, gözyaşı, idrar, anne sütü, kolostrum, periton sıvısı, beyin omirilik sıvısı, bronş lavajı, seminal sıvı ve foliküler sıvı gibi farklı hücre dışı sıvılarda da bulunur (80).

Kan yoluyla taşınan (dolaşan) miRNA'ların nereden kaynaklandığı henüz anlaşılammıştır, fakat vücut dokularından, aynı zamanda beyaz kan hücrelerinden, trombositlerden dolaşıma verildiği düşünülmektedir (81). Hücre dışına gönderilecek olgun miRNA'lar eksozomlar, Ago2 proteini, mikrovezikül veya HDL ile birlikte hücre dışı ortama salınır. miRNA biyogenezi ve ekstraselüler ortama miRNA'ların salınımı Şekil 3'te gösterilmektedir (80). Bir dokuda düşük düzeyde eksprese edilen bir miRNA türü, birden fazla kaynaktan gelen miRNA'lardan dolayı kanda belirgin bir değişiklik göstermeyebilir ya da kandaki miRNA ekspresyon düzeyi beyaz kan hücrelerinin hastalığa sekonder yanıtındaki etkisinden dolayı değişebilir. Bu özellik miRNA analizinde örnek seçiminde önemlidir (81).



Şekil 3. miRNA biyogenezi ve ekstraselüler ortama miRNA'ların salınımı (80)

### miRNA'ların İşlevi

miRNA'lar büyüme, gelişme, organogenez, hücre proliferasyonu, apoptozis, embriyonik kök hücre farklılaşması, oksidatif stres, DNA onarımı, immün yanıt ve metabolizmanın düzenlenmesi gibi birçok biyolojik olaylarda kritik rol oynar. Bu

kritik düzenleyici rollerinden dolayı, miRNA'ların anormal ifadesi kardiyovasküler, nörolojik, immünolojik, endokrinolojik sistemleri, kas-iskelet sistemi ve metabolizmayı içeren sayısız hastalıkta ve karsinogenez patogenezinde önem arz eder (9). Bu yüzden plazma veya serum gibi örneklerde miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin tespiti hastalıkların patolojilerle ilişkisi düşünüldüğünde hastalığın tanısı ve izlemi için yeni biyobelirteçler olarak kullanımını sağlar (82).

### ***Diyabetik Nefropatide miRNA'ların İşlevi***

Diyabetik nefropati ile ilişkili pek çok miRNA bulunmasına rağmen Türkiye'de diyabetik nefropati ile ilişkili miRNA'lar üzerine yapılan yeterli sayıda çalışma mevcut olmayıp bu konuda yabancı kaynaklara daha sık başvurulur.

İnsan dokularında en çok bulunan miRNA'lardan biri olan *miRNA-21*, pek çok malignitenin patojenezinde kapsamlı olarak çalışılmış ve gösterilmiştir. Bu patolojilerin fibrojeniz ile benzerlikleri miRNA-21'in DN progresyonu için olası biyobelirteçlerden biri olduğunu düşündürür (8). Diyabetik nefropatide kollajen 1 $\alpha$ -1 ve -2 (Col1 $\alpha$ 1 ve -2) gibi hücre dışı matriks proteinlerinin birikimi görülür. Bu hücre dışı matriks proteinlerin genlerinin düzenleyicisi olan transforme edici büyüme faktörü  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), böbrekteki mezengiyal hücrelerde artar (83). Renal miRNA-21 ekspresyonunun azalması, TGF- $\beta$  sinyalini baskılar (84). Diyabetik nefropatinin ana mediyatörlerinden olan *V-Akt murin timoma viral onkogen homolog 1* (AKT) kinaz, TGF- $\beta$  ile aktive olur ve glomerüler mezengiyal hücrelerde fibroz, hipertrofi ve hücre sel devamlılık için önemli rol oynar. Akt kinaz, *phosphatase and tensin homolog* (PTEN)'in azaltılmasıyla aktive edilir. miRNA-21 diyabetik nefropatide PTEN'i baskılayarak veya aktifleyerek fibrotik değişikliklere neden olur (11,85,86).

*miRNA-29 ailesi*, *miRNA-29a*, *miRNA-29b* ve *miRNA-29c*'den oluşur. miRNA-29, diyabetik nefropati patogenezinde santral rol oynayan TGF - $\beta$ 1'in prosklerotik etkilerini düzenler (12)

*miRNA-126* böbrek endotel hücrelerinden salınır ve anjiyogenezde önemli bir rol oynamaktadır (87). Diyabetik hastalarda dolaşımdaki miRNA-126 düzeylerinin azalması, miRNA-126'nın diyabetik nefropatiyi de kapsayan diyabetik mikrovasküler hasar ve son dönem böbrek hastalığıyla ilişkilidir (7).

Böbrekte yüksek oranda eksprese edilen *miRNA-192*, *Col1 $\alpha$ 2* genindeki *Zinc finger E-box-binding homeobox (ZEB 2)* E-box represör proteininin ve *ZEB1* E-box represör proteininin (*Smad Interacting protein 1-SIP1*) translasyonunu baskılayarak *Col1 $\alpha$ 2* mRNA'sını arttır. Nihayetinde TGF- $\beta$  artışı sonrası kollajen birikimi artar (13). Ancak ileri evre diyabetik nefropatili hastalarda yapılan bir çalışmada *miRNA-192* ekspresyonu proksimal tübüler epitel hücrelerinde TGF- $\beta$  'ya yanıt olarak azalmıştır ve *miRNA-192* kaybı tübülointerstisyel fibroz ve eGFR'de azalma ile korelasyon göstermektedir (14).

Diyabetli hastalarda TGF- $\beta$ 1'i aktive eden trombospondin-1'in (TSP-1) ekspresyonu artar. Diyabetik nefropatide ise TSP-1 aracılığıyla TGF- $\beta$ 1 artışına neden olan *miRNA-320c* ekspresyonu artar (15).

Diyabetik nefropati ile ilişkili *miRNA*'lar Tablo 8'de özetlenmektedir (5).

Yapılan bazı fare deneylerine göre ise *miRNA-129*, *miRNA-137* ve *miRNA-212* düzeyleri diyabet hastalığında hepatik patoloji ve glukoz metabolizmasıyla ilişkili bulunup bu *miRNA*'ların diyabetik nefropati ile ilgili olan ilişkileri henüz araştırılmamıştır (16,88).

**Tablo 8.** Diyabetik nefropati ile ilişkili miRNA'lar (5)

miRNA'lar	Hedefler	Diyabetik nefropatide yer alan mekanizma	Model
miRNA-29 miRNA-29b miRNA-29c	FBN1, ELN1, MMP2 ITGB1, Col1, Col4 SPRY1	*Mezengiyal hücrelerde kollajenin TGF- $\beta$ /SMAD3'e bağlı olarak artar. *Mikroalbuminüri, renal fibroz (TGF- $\beta$ ) ve inflamasyon (NF- $\kappa$ B). *Bu miRNA'ların normal veya aşırı ekspresyonu albuminüri ve ECM'yi azaltır.	TGF- $\beta$ /SMAD3 -bağımlı, IFN $\alpha$ , NF- $\kappa$ B (insan ve db/db fare)
miRNA-200a/b/c	ZEB1/2, TGF $\beta$ 2, $\beta$ -katenin, FOG	*Sıçan proksimal tübüler epitelyal hücrelerde (NRK52E), TGF- $\beta$ 1 ve TGF- $\beta$ 2'nin uzun süre ve yüksek düzeyde olması, epitelyal mezengiyal geçişi (EMT) ve fibrojenezi uyarır. *miRNA-200 ekspresyon artışı TGF- $\beta$ 1 ve TGF- $\beta$ 2 ekspresyonunu artırır. *Bu miRNA'nın artışı TGF- $\beta$ 2, proliferasyon, Col1, Col4'ü azaltır.	TGF- $\beta$ 1 ve $\beta$ 2, ECH- ilişkili protein1/ NFE2 ilişkili faktör 2 (STZ fare ve MMC'lerde artma)
miRNA-192	$\delta$ EF1 and SIP1	*Mezengiyal hücrelerde TGF- $\beta$ ekspresyonu artar. *Col1 $\alpha$ 1 and Col1 $\alpha$ 2 artışı, TGF- $\beta$ 1'i artırır.	TGF- $\beta$ 1, ZEB1/2, kollajen (STZ diyabetik farede C57'i uyarır. db/db tip 2 diyabetik fare)
miRNA-195	Sirtuin1(Sirt1), SiklinE1, BCL2	*B-hücreli lenfoma 2 (BCL2) protein düzeyi azalır. *Podosit hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonu artar.	B-cell, Kaspaz-8, kaspaz-3 (STZ ile uyarılmış tip 1 fare, podosit kültürü)

miRNA-124	INTEGRIN $\alpha$ 3 $\beta$ 1	*Mekanik stres altında podosit adezyon hasarı olur. *İdrar podositik nefrin, podosit ve albumin atılımı artar.	Glomerüler bazal membran(GBM), podosit (Diyabetik sıçan)
miRNA-1207-5p		*TGF- $\beta$ 1, PAI-1 ve FN1 artar.	TGF- $\beta$ 1, podositler, (podosit ve mezengiyal hücre kültürü, diyabetik fare)
miRNA-21	Akt fosforilasyonu, SMAD7, TGF- $\beta$ 1, tissue inhibitors of metalloproteinase 3 (TIMP3)	* miRNA-21'in TGF- $\beta$ 1'yi artırması fibrozisin şiddeti ile pozitif korelasyon gösterir. *TIMP'lerin düzenlenir. *Akt fosforilasyonu.	TGF- $\beta$ 1, renal hücreler (db/db fare, STZ-fare, plazmid ve renal biyopsi)
miRNA-377	PAK1, MnSOD	* P21 aktive edilmiş kinaz ve süperoksit dismutaz baskılanır. *FN ekspresyonu artar.	Böbrek (diyabetik fare)
miRNA-93	VEGF-A	* VEGF ekspresyonunun artması *Diyabetlilerde normal miR-93 ekspresyonu VEGF ekspresyonunun engeller.	Böbrek (Endotelial hücreler, db/db fare and renal hücre kültürü)
miRNA-216a	PTEN tümör supresyon gen, RNA- binding protein YB-1	*Col1 $\alpha$ 2 ekspresyonu artar. *Hücre fizyolojisi ve biyokimya süreçlerini etkiler. *Hipertrofi	Mezengiyal hücreler, TGF- $\beta$ 1 (renal hücre kültürü ve diyabetik fare)
miRNA-25	NOX4	*NOX4 ekspresyonu artar.	İnsan mezengiyal hücreleri (mezengiyal hücre kültürü ve diyabetik fare)



## GEREÇ VE YÖNTEM

### **ÇALIŞMA GRUBU**

Çalışma grubu, 50 kontrol ve 100 hastadan oluşmaktadır.

#### **Hasta Grubu**

Çalışmaya, Aralık 2017 ve Mayıs 2018 ayları arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Endokrinoloji polikliniğine başvuran Tip 2 diyabetli 51 hasta ve tip 2 diyabetik nefropatili 49 hasta olmak üzere toplam 100 hasta alındı.

n=100; yaş: 58±11 (36-83)

Erkek: n=46; yaş: 60±11 (36-83)

Kadın: n=54; yaş: 56±11 (36-76)

18 yaş ve üzeri Tip 2 Diabetes Mellitus tanısı olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Hasta grubu idrarda albümin atılım düzeylerine göre 3 grupta toplandı (normoalbuminüri: albumin atılımı <30 mg/gün, mikroalbuminüri: albumin atılımı 30-300 mg/gün, makroalbuminüri: albumin atılımı >300 mg/gün).

#### **Kontrol Grubu**

Kontrol grubu, hasta grubuna yaş ve cinsiyet olarak benzer, klinik şikayet ve bulgusu olmayan, sağlıklı 50 bireyden oluşturuldu.

n=50; yaş: 54±12 (30-75)

Erkek: n=24; yaş: 55±11 (30-75)

Kadın: n=26; yaş: 54±13 (30-75)

#### **Hasta Örneklerinin Toplanması ve Analiz Örneklerinin Hazırlanması**

Hastalardan venöz kan örnekleri sabah 08.00-10.30 saatleri arasında, 8-12 saatlik açlıktan sonra oturur pozisyonda, bir vakumlu tüpe (Jelli vakumlu düz biyokimya tüpü; Vacusera, Türkiye) ve iki EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit)'li tam kan tüpüne alındı. Hastalara 24 saatlik idrar toplatıldı. Serumda kan açlık glukozu, total kolesterol (t. kolesterol), trigliserit, HDL-kolesterol (HDL-kol), sistatin C (sis C), kreatinin (s. kreatinin); tam kanda HbA1c, 24 saatlik idrarda albumin

(mikroalbumin), kreatinin (i. kreatinin) düzeylerine bakıldı. Kan ve idrar analizleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında yapıldı. LDL-kolesterol (LDL-kol) ve VLDL-kolesterol (VLDL-kol) *Friedewald* formülüne göre hesaplandı [VLDL-kol = Trigliserit/5; LDL-kol = T. kolesterol-(HDL-kol + trigliserit/5] (TG<400 mg/dL ise). eGFR hesaplanmasında MDRD, CKD-EPI-kreatinin (CKD-EPI-kre) ve CKD-EPI- sistatin C (CKD-EPI-Sis C) formülleri kullanıldı.

miRNA analizi için kullanılacak olan EDTA'lı tam kan tüpü en kısa sürede (buzda bekletilmek şartıyla en fazla 2 saat) 1900 x g'de (3000 rpm) 10 dk, 4° C'de santrifüj edildi. Üstte kalan plazma yeni bir steril eppendorf mikro tüpüne (konik tabanlı) steril ve filtreli pipet ucu kullanılarak otomatik pipetlerle dikkatlice aktarıldı ve 10000 x g'de, 10 dk, 4 °C'de tekrar santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir steril eppendorf mikro tüpüne aktarıldı. -80° C'de dondurulup analize kadar saklandı. miRNA analizinde, miRNA-21-3p, miRNA-29a-3p, miRNA-29b-3p, miRNA-29c-3p, miRNA-126-3p, miRNA-129-1-3p, miRNA-137, miRNA-192-5p, miRNA-212-3p ve miRNA-320c'nin ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

Hasta ve kontrollerin boy, kilo, vücut kütle indeksi (VKI), sistolik kan basıncı (SKB), diastolik kan basıncı (DKB), ailede diyabet öyküsü; hastaların ek olarak diyabet tanı süresi verileri kaydedildi.

### **Etik kurul onayı**

Çalışma öncesi Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu'nun 03.10.2017 tarih ve 13 sayılı no ile Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu onayı alındı. Ayrıca çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılara "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" ile yapılacaklar hakkında bilgi verildi ve gönüllü olduklarına ilişkin imzaları alındı.

## **KULLANILAN CİHAZLAR VE MALZEMELER**

### **Kullanılan Cihazlar**

- Masa üstü soğutmalı santrifüj (Allegra X30R Beckman Coulter, ABD)
- Masa üstü soğutmalı mikrosantrifüj (M-24A Boeco, Almanya)
- 4 C° Buzdolabı (Beko, Türkiye)

- -20 C° Buzdolabı (Beko, Türkiye)
- -80 C° Derin dondurucu (DF490 Nüve, Türkiye)
- Ayarlanabilir otomatik pipet seti (1-10µL, 10-100 µL, 100-1000 µL) (Eppendorf, ABD)
- Vorteks (Biosan, Letonya)
- Modüler P otoanalizör (Roche Cobas 8000, Roche-Hitachi Diagnostics, Japonya)
- HPLC (G8 Tosoh Bioscience, ABD)
- Nanodrop (Nanodrop 2000c Spectrophotometer Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Real-time PCR cihazı (Bio-Rad CFX Connect, ABD)

#### **Kullanılan Sarf Malzemeleri**

- 1-10µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL'lik steril filtreli pipet uçları (Vertex, ABD)
- mL'lik Eppendorf mikro tüpler (Isolab, Almanya)
- Jelli vakumlu düz biyokimya tüpü (Vacusera, Türkiye)
- EDTA'lı tam kan tüpü (Vacusera, Türkiye)
- İdrar tüpü (BD Diagnostics, ABD)
- 200 µL'lik PCR tüpü (Isolab, Almanya)
- İzopropanol (% 100)
- Etanol (% 96-100)
- miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Almanya Katalog no: 217204)
- miRCURY LNA RT Kit (8-64 rxnluk) (Qiagen, Almanya, Katalog no: 339340)
- miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit (4000 rxnluk), (Qiagen, ABD, Katalog no: 339347)
- miRCURY LNA miRNA PCR Assays (200 reaksiyonluk), (Qiagen, ABD, Katalog no: 339306)
- miRNA-spesifik primerler (Qiagen, ABD)
  - ✓ hsa-miR-21-3p (Katalog no: YP00204302, Lot no: 201801290079-1)

- ✓ hsa-miR-29a-3p (Katalog no: YP00204698, Lot no: 201706010686-1)
- ✓ hsa-miR-29b-3p (Katalog no: YP00204679, Lot no: 201706010725-1)
- ✓ hsa-miR-29c-3p (Katalog no: YP00204729, Lot no: 201706010583-1)
- ✓ hsa-miR-126-3p (Katalog no: YP00204227, Lot no: 201706010673-1)
- ✓ hsa-miR-129-1-3p (Kat. no: YP00206074, Lot no: 201705190328-1)
- ✓ hsa-miR-137 (Katalog no: YP00206062, Lot no: 201709110108-1)
- ✓ hsa-miR-192-5p (Katalog no: YP00204099, Lot no: 201706010549-1)
- ✓ hsa-miR-212-3p (Katalog no: YP00204170, Lot no: 201705050123-1)
- ✓ hsa-miR-320c (Katalog no: YP00205706, Lot no: 201705190355-1)
- Referans gen (Qiagen, ABD)
  - ✓ U6 snRNA (hsa, mmu) (Katalog no: YP00203907, Lot no: 201801190038-1)
- PCR plate (Bio-Rad, ABD) ve plate seal (Bio-Rad, ABD)

## **BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER**

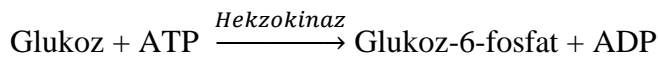
### **Ölçülen analitler**

Hastaların serumunda kan açlık glukozu, total kolesterol, trigliserit, HDL-kolesterol, sistatin C, kreatinin; 24 saatlik idrarında albumin ve kreatinin düzeyleri Roche Cobas 8000 otoanalizöründe ticari kitlerle analiz edildi. Tam kanda HbA1c, HPLC yöntemiyle G8 Tosoh Bioscience cihazıyla ölçüldü.

### **Ölçüm Yöntemleri**

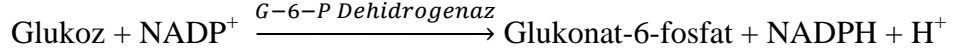
#### ***Glukoz***

Glukoz konsantrasyonu enzimatik fotometrik analiz yöntemiyle belirlendi. Hekzokinaz glukozun ATP tarafından glukoz-6-fosfata fosforilasyonunu katalize eder.



Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, NADP'nin varlığında glukoz-6-fosfatı (G-6-P) glukonat-6-fosfata okside eder. Başka karbonhidrat oksitlenmez. Reaksiyon

sırasında NADPH oluşum hızı glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçülür.

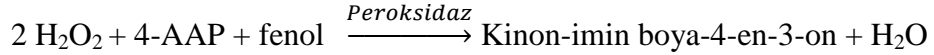
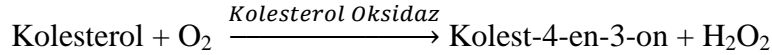
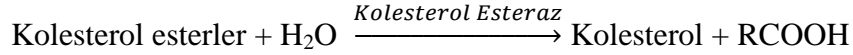


Referans aralığı: 15-60 yaş: 74-106 mg/dL (4,11-6,05 mmol/L)

60-100 yaş: 82-115 mg/dL (4,56-6,38 mmol/L)

### ***Total kolesterol***

Total kolesterol konsantrasyonu enzimatik kolorimetrik analiz yöntemiyle belirlendi. Kolesterol esterleri, kolesterol esterazın etkisiyle bölünerek serbest kolesterol ve yağ asitleri ortaya çıkarır. Ardından, kolesterol oksidaz kolesterolün kolest-4-en-3-on ve hidrojen peroksit oksidasyonunu katalize eder. Oluşan hidrojen peroksit, peroksidazın varlığında fenol ve 4-aminofenazonun oksidatif bağlanması etkileyerek kırmızı kinon-imin boya oluşmasına neden olur.

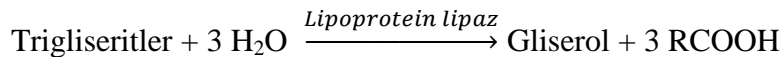


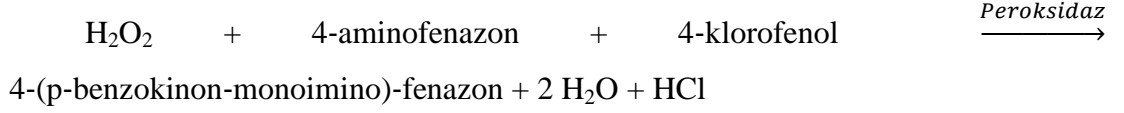
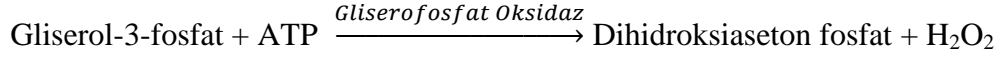
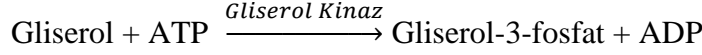
Oluşan boyanın renk yoğunluğu kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Absorbanstaki artış ölçülerek tayin edilir.

Referans aralığı: <200 mg/dL (5,2 mmol/L)

### ***Trigliserit***

Trigliserit konsantrasyonu enzimatik kolorimetrik analiz yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemde trigliseritlerin gliserole, hızlı ve tam olarak hidroliz olabilmesi için lipoprotein lipaz kullanılır. Üretilen hidrojen peroksit daha sonra 4-aminofenazon ve 4-klorofenol ile kırmızı bir boya maddesi oluşturmak için peroksidazın katalitik etkisi altında reaksiyona girer.

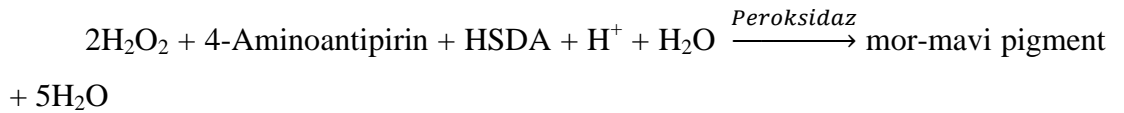
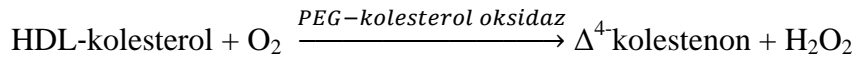
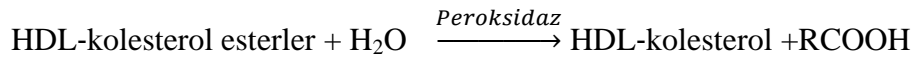




Referans aralığı: <200 mg/dL (5,2 mmol/L)

### ***HDL-kolesterol***

HDL-kolesterol konsantrasyonu ölçümü enzimatik kolorimetrik analiz yöntemiyle belirlendi. Magnezyum iyonlarının varlığında dekstran sülfat, Polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş enzimlere karşı dirençli LDL, VLDL ve şilomikronlar ile seçici olarak suda çözünür kompleksler oluşturur. HDL kolesteroldeki kolesterol konsantrasyonu, amino gruplara PEG ile bağlanmış kolesterol esteraz ve kolesterol oksidaz ile enzimatik olarak spektrofotometrik yöntemle ölçülür. Kolesterol esterleri, kolesterol esteraz aracılığıyla serbest kolesterol ve yağ asitlerine kantitatif olarak parçalanır. Oksijen varlığında kolesterol, kolesterol oksidaz tarafından oksidize olarak  $\Delta^4$ -kolestenon ve hidrojen peroksiti oluşturur. Peroksidaz varlığında, oluşan hidrojen peroksit 4-amino-antipirin ve Sodyum N-(2-hidroksi-3-sülfopropil)-3,5-dimethoksianilin (HSDA) ile reaksiyona girerek mor-mavi bir boya oluşturur. Bu boyanın renk yoğunluğu kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçülür.



Referans aralığı: kadın: >45 mg/dL (1,15 mmol/L)

erkek: >35 mg/dL (0,9 mmol/L)

### ***VLDL-kolesterol ve LDL-kolesterol***

VLDL-kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyi 'Friedewald' formülüne göre hesaplandı. Serum trigliserit düzeyi 400 mg/dL' nin üzerinde olduğu zaman, bu formül kullanılmamaktadır.

$$\text{VLDL-kolesterol} = \text{Trigliserit}/5$$

$$\text{LDL-Kolesterol} = \text{Total kolesterol} - [(\text{HDL-kolesterol}) + (\text{Trigliserit}/5)]$$

VLDL-kolesterolün referans aralığı: kadın: 7-47 mg/dL (0,18-1,20 mmol/L)

erkek: 8-32 mg/dL (0,20-0,82 mmol/L)

Referans aralığı: <100 mg/dL (2,59 mmol/L)

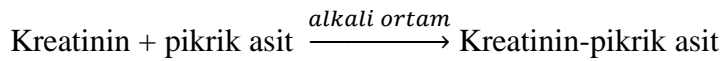
### ***Sistatin C***

Sistatin C konsantrasyonu ölçümü partikül yüzeyi genişletilmiş immüntürbidimetrik analiz yöntemiyle belirlendi. İnsan sistatin C, anti-sistatin C antikorlarıyla kaplı lateks partikülleri ile aglütinasyon gösterir. Oluşan agregat 546 nm'de türbidimetrik olarak tayin edilir.

Referans aralığı: 0,61-0,95 mg/L

### ***Kreatinin***

Kreatinin konsantrasyon ölçümü kinetik kolorimetrik analiz yöntemiyle belirlendi. Bu kinetik kolorimetrik test, Jaffé yöntemine dayanır. Alkali ortamda kreatinin pikrik asit ile sarı-turuncu bir kompleks oluşturur. Boya oluşum hızı, örnekteki kreatinin konsantrasyonu ile orantılıdır.



Referans aralığı: Serumda: kadın: 0,50-0,95 mg/dL (44-80 µmol/L)

erkek: 0,70-1,20 mg/dL (62-106 µmol/L)

24 saatlik idrarda: kadın: 740-1570 mg/gün (7000-14000 µmol/gün)

erkek: 1040-2350 mg/gün (9000-21000 µmol/gün)

### ***İdrarda Albumin (Mikroalbumin)***

İdrarda albumin konsantrasyon ölçümü immünotürbidimetrik analiz yöntemiyle belirlendi. Örnekteki antijenlerle reaksiyona giren anti-albumin antikorlarının oluşturduğu, antijen-antikor komplekslerinin oluşturduğu aglütinasyon 340 nm'de turbidimetrik olarak ölçülür.

Referans aralığı: 0-30 mg/gün

### ***Hemoglobin A1c***

HbA1c iyon değişimi yöntemi ile HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) cihazında çalışıldı.

### ***Hesaplanan GFR (eGFR)***

eGFR CKD-EPI ve MDRD formüllerine göre hesaplandı.

CKD-EPI kreatinin eGFR (mL/dk/1,73 m<sup>2</sup>) = 141 × min. (Serum kreatinin/κ ya da 1)<sup>α</sup> × maks. (Serum kreatinin/κ ya da 1)<sup>-1,209</sup> × 0,993<sup>Yaş</sup> × 1,018 (kadınsa) × 1,159 (siyah ırksa)

*Serum kreatinin birimi mg/dL'dir.*

*κ, kadınlarda 0,7 erkeklerde 0,9 alınmalıdır.*

*α, kadınlarda -0,329 erkeklerde -0,411 alınmalıdır.*

*Min., en düşük serum kreatinin/κ ya da 1 anlamına gelir.*

*Maks., en yüksek serum kreatinin/κ ya da 1 anlamına gelir.*

CKD-EPI sistatin C (mL/dk/1,73 m<sup>2</sup>)=133 × min. (Serum Sistatin C / 0,8 ya da 1)<sup>-0,499</sup> × maks. (Sistatin C / 0,8 ya da 1)<sup>-1,328</sup> × 0,996<sup>Yaş</sup> (kadınsa 0,932)

*Serum serum sistatin C birimi mg/L'dir.*

*Min., en düşük sistatin C/0,8 ya da 1 değeri anlamına gelir.*

*Maks., en yüksek sistatin C/0,8 ya da 1 değeri anlamına gelir.*

MDRD eGFR (mL/dk/1,73 m<sup>2</sup>) = 175 × (Serum kreatinin)<sup>-1,154</sup> × (Yaş)<sup>-0,203</sup> × (0,742 kadınsa) × (1,212 Afrikalıysa)



## **miRNA ANALİZİ**

### **1. Total RNA İzolasyonu**

miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kiti (89), örneklerin guanidin bazlı lizisi, inhibitörlerin (proteinlerin) ayrılması ve total RNA'nın silika membran bazlı saflaştırılmasını sağlar.

Kitte bulunan tampon RPL, lizisi kolaylaştırmak ve protein kompleksleri ve RNazları denatüre etmek için guanidin tiyosiyanat ve deterjanları (SDS) içerir. Bu nedenle, tampon RPL içinde lizise uğrayan numunelerdeki RNA stabildir ve bozunmadan korunur. Tampon RPL, plazma örneklerine eklenir. Tam bir lizis sağlamak için iyice karıştırıldıktan sonra, denature olan inhibitörlerin (çoğunlukla serum/plazma numunelerinde yüksek oranda konsantrasyon olan proteinlere) çöktürmek için Tampon RPP eklenir. Santrifüj edilir. RNA'yı içeren süpernatant yeni bir mikro tüpe aktarılır ve tüm RNA molekülleri için uygun bağlama koşullarını oluşturmak üzere izopropanol eklenir. Numune daha sonra RNeasy UCP MinElute spin kolonuna uygulanır, burada toplam RNA membrana bağlanır ve bulaşlar etkin bir şekilde yıkanır. Daha sonra RNA, RNaz içermeyen suyla elüe edilir.

### ***Reaktiflerin Hazırlanması***

Analize kadar miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kiti oda sıcaklığında, RNeasy® UCP MinElute® spin kolonları 4°C'de, reaktifler oda sıcaklığında (15–25 °C) saklandı.

RNA izolasyonunun tüm basamakları oda sıcaklığında (15-25°C) yapıldı. Tampon RWT'ye 15 mL ve Tampon RPE'ye 33 mL etanol (% 96-100) ilave edildi.

-80°C'de dondurulmuş örnekler buz içerisinde yavaşça çözdürüldü. Tüm santrifüj adımları, oda sıcaklığında (15-25°C) yapıldı.

### ***RNA izolasyonu çalışma basamakları***

1. Dondurulmuş plazma örnekleri çözdürüldü.
2. 200 µL plazmalar 2 mL'lik reaksiyon tüplerine aktarıldı.
3. 60 µL Tampon RPL eklendi. Tüp kapakları kapatıldı ve 10 s vorteksle karıştırıldı. 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. 20 µL tampon RPP eklendi. Tüp kapakları kapatıldı ve 25 s vorteksle karıştırıldı. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

5. Çökeltiyi peletlemek için oda sıcaklığında 3 dk 12000 x g'de santrifüj yapıldı.

6. Süpernatant (200 µl) yeni bir reaksiyon tüpüne aktarıldı. 200 µl izopropanol eklendi. Vorteksle 10 s iyice karıştırıldı. Tüm örnekler her bir RNeasy UCP MinElute kolonuna aktarıldı. Kapağı kapatılıp 14000 x g de 45 s santrifüj edildi. Akan kısım ve toplama tüpleri atıldı. Yeni toplama tüpleri konuldu.

7. RNeasy UCP MinElute spin kolonuna 700 µl Tampon RWT pipetlendi. Kapağı kapatıldı ve 14000 x g'de 45 s santrifüj edildi. Akan kısım ve toplama tüpleri atıldı. Yeni toplama tüpleri konuldu.

8. RNeasy UCP MinElute spin kolonuna 500 µl Tampon RPE pipetlendi. Kapağı kapatıldı ve 14000 x g'de 45 s santrifüj edildi. Akan kısım ve toplama tüpleri atıldı. Yeni toplama tüpleri konuldu.

9. RNeasy UCP MinElute spin kolonuna 500 µl % 80 etanol eklendi. Kapağı kapatıldı ve 14000 x g'de 2 dk santrifüj edildi. Akan kısım ve toplama tüpleri atıldı.

10. RNeasy UCP MinElute spin kolonuna yeni bir 2 mL'lik toplama tüpleri yerleştirildi. Spin kolonun kapağı açıldı ve membranı kurutmak için 5 dk 14000 x g santrifüj edildi. Akan kısım ve toplama tüpleri atıldı.

11. RNeasy UCP MinElute spin kolonunu yeni 1,5 mL'lik toplama tüpleri yerleştirildi. Spin kolon membranının merkezine doğrudan 20 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dk inkübe edildi. Kapaklar kapatıldı ve RNA'yı elue etmek için 14000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.

12. Yaklaşık 18 µL'lik RNA içeren elüsyon 1,5 mL'lik tüplerde buz içerisinde aynı gün cDNA (*complementary DNA*) elde edilinceye kadar saklandı.

Total RNA konsantrasyonu ve saflıkları spektrofotometrik yöntemle nanodrop cihazında ölçüldü. Tüm örneklerin “konsantrasyon, A260, A280, A260/280 oranı” değerleri kaydedildi. Her bir örneğin “stok konsantrasyonu” hesaplandı.

## 2. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

miRCURY LNA RT Kiti (90) ile total RNA, kit içerisinde yer alan ters transkripsiyon enzim karışımı kullanılarak daha stabil olan cDNA'ya çevrilir.

### *Reaktiflerin Hazırlanması*

miRCURY LNA RT Kiti teslim alındıktan hemen sonra dondurucuda -20°C'de analize kadar saklandı. Tekrarlanan donma-çözülme döngülerinden kaçınmak için, reaktifler -20°C'de küçük miktarlar halinde saklandı. RNA'nın bozunma riskini en aza indirmek için tüm reaksiyonlar buz üzerinde gerçekleştirildi.

### *cDNA Sentezi çalışma basamakları*

Sıcaklık adımları, Tablo 9'da açıklanan döngü protokolü kullanılarak uygun şekilde ayarlandı.

**Tablo 9.** cDNA sentezi için PCR protokolü (90)

<b>Basamak</b>	<b>Süre</b>	<b>Sıcaklık</b>
Ters transkripsiyon	60dk	42°C
Reaksiyonun inaktivasyonu	5dk	95°C
Saklama	Süresiz	-20°C

1. Kalıp RNA ve 5x miRCURY RT Reaksiyon Tamponu buz üzerinde çözdürüldü. RNaz içermeyen su oda sıcaklığında çözdürüldü (15-25°C). Kullanımdan hemen önce, 10x miRCURY RT enzimi dondurucudan çıkarıldı. Her bir çözelti hafifçe karıştırıldı. Tüplerin kenarlarında kalan sıvının toplanması için kısa bir süre santrifüj yapıldı ve daha sonra buz üzerinde tutuldu.

2. Tüp içine 80 µL nükleaz içermeyen su eklenerek UniSp6 RNA spike-in tekrar süspansiyon haline getirildi. Vorteksle karıştırıldı. RNA spike-in tamamen çözünene kadar buz üzerinde 20-30 dk bekletildi. Vorteksle karıştırıldı ve tüplerin kenarlarında kalan sıvının toplanması için kısa bir süre santrifüj yapıldı. Alikotlanıp -20°C'de saklandı.

3. Plazmadan izole edilen RNA 2µL olarak alındı.

4. RT master karışımı Tablo 10'a göre buz üzerinde hazırlandı (90). Karıştırıldı ve buz üzerinde tutuldu.

Not: Birden fazla reaksiyon için, toplam reaksiyon sayısı için gerekenden % 10 daha fazla hacimli bir karışım hazırlandı. Her bir RNA örneği ile uygun hacimdeki ana karışımı ayrı ayrı tüplere dağıtıldı.

5. 60 dk boyunca 42 ° C'de PCR cyler'da inkübe edildi.

6. Ters Transkriptaz Enzimi inaktivasyonu için 5 dk 95°C'de karışım inkübe edildi.

7. Hemen 4°C'ye kadar soğutuldu.

Not: Elde edilen cDNA hemen kullanılacaksa 4°C'de, yoksa -20°C'de saklandı.

**Tablo 10.** Bir örnek için cDNA sentez protokolü (90)

<b>Reaksiyon karışımı</b>	<b>Hacim</b>
5x miRCURY RT reaksiyon tamponu	2 µL
RNaz içermeyen su	4,5 µL
10x miRCURY RT enzim karışımı	1 µL
Sentetik spike-in	0,5 µL
Total RNA	2 µL
<b>Toplam hacim</b>	<b>10 µL</b>

### **3. Real-Time PCR Analizi (RT-PCR Analizi)**

miRCURY SYBR-Green PCR Kit (90) içerisinde yer alan QuantiNova DNA Polimerazı, *Thermus aquaticus*'dan izole edilmiş, rekombinant, 94 kDa'luk DNA polimerazın değiştirilmiş bir şeklidir. QuantiNova DNA Polimeraz, inaktif durumdadır ve ortam sıcaklığında enzim aktivitesine sahip değildir. Enzim 2 dk 95°C'de inkübasyon ile aktive edilir.

### ***Reaktiflerin Hazırlanması***

miRCURY SYBR-Green PCR Kit dondurucuda -20°C'de saklandı ve ışıktan korundu. Primerler -20°C'de saklandı. Tekrarlanan donma-çözme döngülerinden kaçınmak için küçük miktarlara ayrıldı.

Primerlerin olduğu tüpler açılmadan önce santrifüj edildi. Primerlerin olduğu her bir tüpe 220 µL nükleaz içermeyen su eklendi. Oda sıcaklığında 20 dk bekletildi. Vorteksle karıştırılıp, santrifüj edildi. Küçük miktarlara ayrılarak -20°C'de saklandı. Tablo 11'de çalışmada araştırılan hedef miRNA'ların baz dizileri gösterilmiştir (91).

**Tablo 11.** Hedef miRNA dizileri (91)

<b>miRNA tipi</b>	<b>Baz dizisi</b>
miRNA-21-3p	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU
miRNA-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
miRNA-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
miRNA-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
miRNA-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
miRNA-129-1-3p	AAGCCCUUACCCCAAAAAGUAU
miRNA-137	UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG
miRNA-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC
miRNA-212-3p	UAACAGUCUCCAGUCACGGCC
miRNA-320c	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU

PCR reaksiyonunda sıcakta inkübasyon olduğundan dolayı plate'in buz üzerinde tutulmasına gerek yoktur.

### ***RT-PCR çalışma basamakları***

1. Master Mix, kalıp cDNA, primerleri, RNaz içermeyen su çözdürüldü. Her çözelti kısa süre vorteksle karıştırılıp santrifüj edildi.

2. 2 µL cDNA'ya 118 µL RNaz içermeyen su eklenerek 60 kat seyreltildi.

3. Tablo 12'ye göre bir reaksiyon karışımı hazırlandı (90).

**Tablo 12.** Hedef genin RT-PCR protokolü (90)

<b>Reaksiyon karışımı</b>	<b>5 µL</b>
2x miRCURY SYBR Green Master Miks	5 µL
Hedef Gen Primer Miks	1 µL
1/60 sulandırılmış cDNA	3 µL
Nükleaz içermeyen su	1 µL
<b>Toplam hacim</b>	<b>10 µL</b>

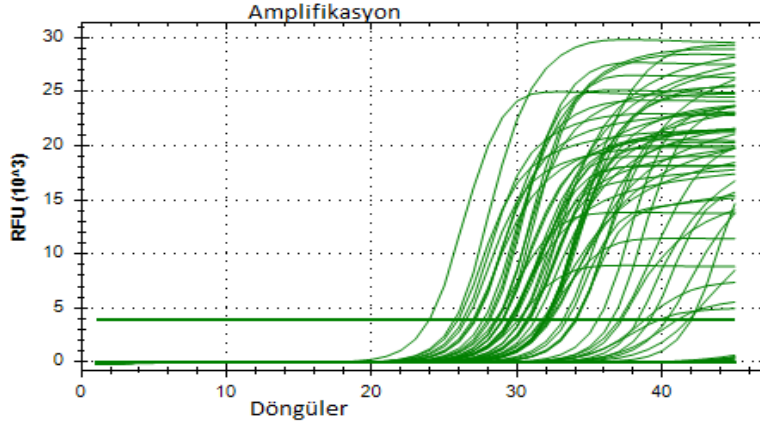
4. Plate kuyucuklarına 10µL dağıtıldı.
5. Real-time cyler programı Tablo 13'e göre kuruldu.
6. Plate real-time cyler'a yerleştirildi ve program çalıştırıldı.

**Tablo 13.** RT-PCR ısı protokolü (90)

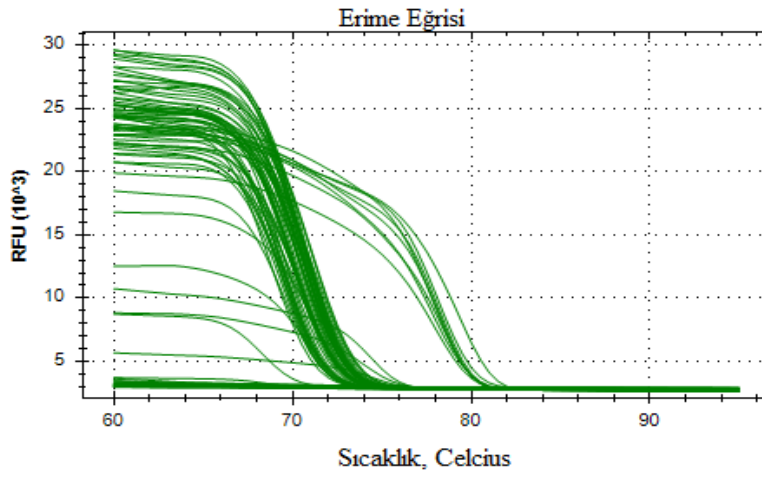
<b>Döngü sayısı</b>	<b>Basamak</b>	<b>Süre</b>	<b>Sıcaklık</b>
1	Başlangıç sıcaklığı	2 dk	95°C
45	Denatürasyon	10s	95°C
	Bağlanma/Uzama	60s	56°C
1	Erime eğrisi analizi		60-95°C

miRNA ekspresyon düzeylerine Bio-Rad CFX Connect RT-PCR cihazı ile bakıldı. Bio-Rad CFX Maestro yazılımı (Bio-Rad, ABD) ile logaritmik lineer çizelgede RT-PCR cihazında elde edilen gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri ile ekspresyon düzeyleri belirlendi. Olguların miRNA tipleri sırasıyla miRNA-21-3p, miRNA-29a-3p, miRNA-29b-3p, miRNA-29c-3p, miRNA-126-3p, miRNA-129-1-3p, miRNA-137, miRNA-192-5p, miRNA-212-3p, miRNA-320c ve U6 referans gen olup RT-PCR ekspresyonlarının ve erime eğrilerinin görüntülerinin bir örneği Şekil 4'te gösterilmektedir.

A.



B.



**Şekil 4.** miRNA-21-3p, miRNA-29a-3p, miRNA-29b-3p, miRNA-29c-3p, miRNA-126-3p, miRNA-129-1-3p, miRNA-137, miRNA-192-5p, miRNA-212-3p, miRNA-320c ve U6 referans genin RT-PCR ekspresyonlarının (A) ve erime eğrilerinin (B) görüntüleri

#### **Real-Time PCR (RT-PCR) Metodu**

miRNA'ları saptamak için kullanılan ilk üç yöntem northern blotting, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ve mikroarray olup aralarında en sık RT-PCR kullanılır (81).

Real-time PCR teknolojisi DNA'nın ya da RNA örneklerinin çoğaltımını ve ürünlerinin miktarını tek bir tüpte tespit edebilen bir yöntemdir. Floresan ışımaya tekniklerinin moleküler genetik yöntemlerde kullanıma girmesi ile birlikte bilinen PCR (*Polimeraz Chain Reaction*) geliştirilerek oluşturulan bu teknik gen ekspresyon çalışmalarının hızına ivme kazandırmıştır (92).

RT-PCR'de, veriler tek bir son noktadan ziyade nükleik asit amplifikasyonu sırasında toplanır. Bu teknikte, termal döngü sırasında floresanı sağlayan molekülleri ve enstrümantasyonu kullanarak floresan ışımaya kaydedilir. Elde edilen veriler, nükleik asit numunesini tanımlama, miktarı ve sekansı hakkında bilgi sağlar. Floresan boyalar veya DNA'nın göreceli miktarını sinyalledebilen probalar, amplifikasyon öncesi PCR karışımına eklenir. Amplifikasyon ve floresan takibi için aynı reaksiyon tüpü kullanılır ve numune transferleri, reaktif ilaveleri, bağlama veya yıkama aşamaları yoktur, böylece kontaminasyonu riski ortadan kalkar. Süreç basit ve hızlı olduğu için, RT-PCR klinik laboratuvarındaki birçok geleneksel tekniğin yerini almaktadır (93).

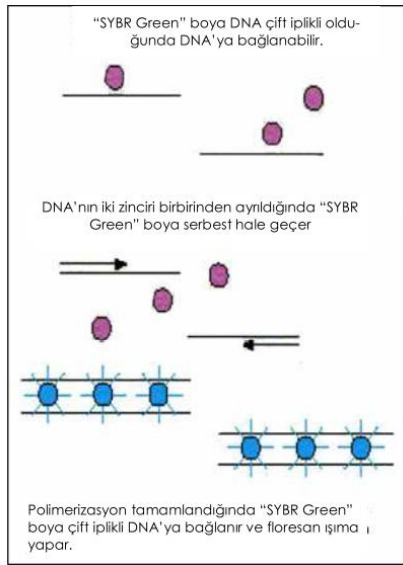
RT-PCR'da floresan sinyali ile çift zincirli PCR ürününün miktarı tespit edilir. Gerçek zamanlı PCR'de birçok farklı floresan sistemi kullanılmaktadır. Eğer hedef DNA varsa, floresan artar. PCR sırasında sinyalin erken görülmesi DNA miktarının fazla oluşuna bağlıdır. Ayrıca, sıcaklık yükseltilecek bir erime eğrisi oluşturulabilir. Erime analizi, DNA'nın ayrışma (*melting*) kinetiğini görüntülemek için geliştirilen bir yöntemdir ve amplifiye edilmiş ürünün kimliğini doğrulamak ve sekans varyantlarını tek bir tabana kadar saptamak için kullanılabilir (94). Çift zincirli DNA örnekleri sıcaklığın artmasıyla ayrışır, boya salınır ve floresan azalır. Bu floresandaki azalış DNA'nın %50'sinin denatüre ( $T_m$ ) olmasıyla giderek daha hızla artar. Floresan ölçüm "erime eğrisi (*melting curve*)" olarak kaydolur. Aynı zamanda bu eğriler "denatürasyon eğrileri" olarak da ifade edilir (95).

### ***SYBR Green I Yöntemi***

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında SYBR Green I yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak RT-PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. SYBR Green I en fazla



kullanılan boya çeşitidir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Amplifikasyonun başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve SYBR Green I boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış RT-PCR cihazının monitöründen izlenebilir (93,96). SYBR Green I yöntemi Şekil 5'te gösterilmektedir (96).



Şekil 5. SYBR Green I yöntemi (96)

### **KALİTE KONTROL**

Çalışmanın yapıldığı süre içerisinde laboratuvarımızın iç ve dış kalite kontrol sonuçlarından yararlandı. Çalışmanın yürütüldüğü sürede (Aralık 2017-Mayıs 2018), glukoz, total kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserit, kreatinin, mikroalbumin ve HbA1c analitlerinden elde edilen iç kalite kontrol sonuçları tablo 14'te, glukoz, total kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserit, idrarda kreatinin, mikroalbumin ve HbA1c analitlerinin dış kalite kontrol sonuçları Tablo 15'te verilmiştir.

### **İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

G\*Power 3.1 (Faul, Erdfelder, Lang ve Bucher, 2007) programı ile yapılan güç analizi sonucunda çalışmaya en az 150 kişi alındığında (her grup için 50 kişi) %95 güvenle %90 güç elde edileceği hesaplandı.

Analizlerin sonunda ekspresyonları tespit edilebilen her miRNA için birer Ct (*threshold cycle*: döngü sayısına karşılık gelen PCR sinyalinin logaritmik-lineer grafiğinde, miRNA ekspresyon miktarının eşik değeri geçtiği döngü sayısı) değeri elde edildi. Tüm örneklerde her miRNA için ayrı ayrı  $\Delta Ct$  ( $\Delta Ct =$  ilgili genin Ct değeri–referans genin Ct değeri) hesaplandı.  $2^{-\Delta Ct}$  formülü kullanılarak göreceli miRNA ekspresyon değerleri hesaplandı. Tüm örnekler için hesaplanan  $2^{-\Delta Ct}$  değerleri normal dağılıma uymadığından her bir miRNA ‘ya ait ortanca  $2^{-\Delta Ct}$  değeri hesaplandı ve birbiriyle istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Hasta ve kontrollerin miRNA ekspresyon seviyeleri, ortanca  $2^{-\Delta Ct}$  sonuçları oranlanarak göreceli olarak tekrar hesaplanarak sonuçlar kat değişimi olarak verildi ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi) (97).

Veriler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences versiyon 22, Chicago, IL, ABD) paket programıyla analiz edildi. Hasta bilgileri (yaş, cinsiyet, boy, kilo, tansiyon, özgeçmiş, soygeçmiş) ve test sonuçları bütün diyabetik hastaların kendi arasında normoalbuminüri, mikroalbuminüri ve makroalbuminüri olarak üç alt gruba ayrılmasından sonra değerlendirilip, sonuçlar bu alt gruplar arasında ve sağlıklı bireylerle karşılaştırmalar şeklinde verildi. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm analizlerde  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ayrıca sürekli değişkenlerin arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon analizleriyle ve kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar ise Ki-kare analizi ile incelendi. Korelasyon analizinde r (korelasyon kat sayısı) değeri 0,000-0,49 aralığı zayıf ilişki, 0,50-0,69 aralığı orta ilişki,  $\geq 0,70$  olanlar güçlü ilişki olarak kabul edildi. miRNA’ların ekspresyon düzeyleri kullanılarak Receiver Operating Characteristic (ROC) eğrileri çizildi ve diyabetik nefropatili olgularda tanısal özellik taşıyabilecek miRNA tipleri belirlendi.

## BULGULAR

### Kalite Kontrol Sonuçları

Çalışmanın yürütüldüğü sürede (Aralık 2017–Mayıs 2018) glukoz, total kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserit, sistatin C, serum kreatinin, serum albumin, mikroalbumin, idrar kreatinin, HbA1c analitlerinden elde edilen iç kalite kontrol sonuçları Tablo 14’te gösterilmektedir.

**Tablo 14.** Biyokimyasal testlerin analitik performansı

<b>Analit</b>	<b>Kontrol Düzeyi</b>	<b>n</b>	<b>Hedef Değer</b>	<b>Xort</b>	<b>±SD</b>	<b>%CV</b>
<b>Glukoz (mg/dL)</b>	Düzyey 1	178	90-110	104,22	6,20	5,95
	Düzyey 2	178	214-266	244,89	6,89	2,81
<b>T. Kolesterol (mg/dL)</b>	Düzyey 1	186	91-111	100,79	4,05	4,02
	Düzyey 2	186	149-185	170,01	7,32	7,30
<b>HDL-Kol. (mg/dL)</b>	Düzyey 1	241	25,8-35,8	29,48	11,72	5,84
	Düzyey 2	241	55,7-77,3	63,97	2,74	4,29
<b>Trigliserit (mg/dL)</b>	Düzyey 1	204	109-132	121,94	2,98	2,44
	Düzyey 2	204	197-241	219,60	6,21	2,83
<b>Sistatin C (mg/L)</b>	Düzyey 1	20	0,99-1,09	1,02	0,03	3,23
	Düzyey 2	21	1,76-1,94	1,80	0,06	3,40
<b>S. Kreatinin (mg/dL)</b>	Düzyey 1	220	0,95-1,23	1,06	0,06	5,99
	Düzyey 2	217	3,38-4,34	3,88	0,20	5,23
<b>S. Albumin (mg/dL)</b>	Düzyey 1	192	2,92-3,72	3,33	0,13	3,99
	Düzyey 2	196	4,18-5,34	4,91	0,18	3,77
<b>Mikroalbumin (mg/L)</b>	Düzyey 1	32	28-38,8	34,35	1,33	3,88
	Düzyey 2	34	98-134	122,94	4,25	3,46
<b>İ. Kreatinin (mg/dL)</b>	Düzyey 1	24	44,1-56,5	51,37	4,03	7,84
	Düzyey 2	24	86,7-110,3	106,20	6,54	6,16
<b>HbA1c (%)</b>	Düzyey 1	80	4,7-5,3	4,99	0,07	1,32
	Düzyey 2	80	9,3-10,3	9,83	0,04	0,86

Çalışmanı yürütüldüğü sürede (Aralık 2017-Mayıs 2018) glukoz, total kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserit, serum kreatinin, serum albumin, HbA1c analitlerinden elde edilen dış kalite kontrol sonuçları Tablo 15’te gösterilmektedir.

**Tablo 15.** Biyokimyasal testlerin Aralık 2017-Mayıs 2018 dış kalite kontrol sonuçları

<b>Analit</b>	<b>Aylar</b>	<b>Sonuç</b>	<b>Grup Ortalama Değeri</b>	<b>SDI</b>	<b>Bias</b>
<b>Glukoz</b> (mg/dL)	<b>Aralık</b>	69	67,1	+1,2	+2,8
	<b>Ocak</b>	27	26,4	+0,6	+2,3
	<b>Şubat</b>	144	147	-0,9	-2
	<b>Mart</b>	68	66,9	+0,7	+1,6
	<b>Nisan</b>	27	26,3	+0,7	+2,8
	<b>Mayıs</b>	150	147	+1,0	+2,1
<b>T.Kolesterol</b> (mg/dL)	<b>Aralık</b>	262	263	-0,08	-0,2
	<b>Ocak</b>	346	348	-0,2	-0,7
	<b>Şubat</b>	89	92,3	-1	-3,5
	<b>Mart</b>	255	260	-0,6	-1,7
	<b>Nisan</b>	348	345	+0,3	+0,7
	<b>Mayıs</b>	91	91,8	-0,2	-0,8
<b>HDL-Kol.</b> (mg/dL)	<b>Aralık</b>	38	38,1	-0,05	-0,2
	<b>Ocak</b>	52	46,2	+1,7	+12,5
	<b>Şubat</b>	17,8	17,2	+0,5	+3,7
	<b>Mart</b>	40	38,5	+0,5	+3,8
	<b>Nisan</b>	52,3	46,8	+1,4	+11,7
	<b>Mayıs</b>	18,4	17,5	+0,7	+4,9
<b>Trigliserit</b> (mg/dL)	<b>Aralık</b>	145	142	+0,5	+2,05
	<b>Ocak</b>	191	186	+1,04	+2,6
	<b>Şubat</b>	50	49,8	+0,1	+0,4
	<b>Mart</b>	143	142	+0,2	+0,6
	<b>Nisan</b>	185	184	+0,3	+0,7
	<b>Mayıs</b>	46	48,5	-0,9	-5,07
<b>S. Kreatinin</b> (mg/dL)	<b>Aralık</b>	2,7	2,7	+0,5	+1,2
	<b>Ocak</b>	3,3	3,4	-1,3	-4,03
	<b>Şubat</b>	1,1	1,02	+1,6	+7,9
	<b>Mart</b>	2,7	2,6	+1,3	+4,3
	<b>Nisan</b>	3,3	3,4	-0,8	-2,8
	<b>Mayıs</b>	0,9	1,01	-0,4	-0,3
<b>S. Albumin</b> (mg/dL)	<b>Aralık</b>	4,1	4,1	-0,6	-0,1
	<b>Ocak</b>	4,9	4,9	-0,05	-0,1
	<b>Şubat</b>	2,3	2,4	-1,3	-5,1
	<b>Mart</b>	4,3	4,1	+1,4	+4,1
	<b>Nisan</b>	5,06	4,9	+0,5	+1,3
	<b>Mayıs</b>	2,3	2,4	-1,2	-4,3
<b>HbA1c</b> (%)	<b>Aralık</b>	9,5	9,9	-0,3	-4,6
	<b>Ocak</b>	5,6	5,8	-0,9	-4,4
	<b>Şubat</b>	10,7	10,8	-0,3	-0,09
	<b>Mart</b>	10,7	10,9	-0,9	-1,9
	<b>Nisan</b>	5,6	5,8	-0,9	-3,6
	<b>Mayıs</b>	5,7	5,7	-0,2	-1,1

## Çalışma Gruplarının Özellikleri ve Biyokimyasal Ölçüm Sonuçları

Çalışma gruplarının özellikleri ve biyokimyasal ölçüm sonuçları Tablo 16'da gözlenmektedir.

**Tablo 16.** Çalışma gruplarının özellikleri ve biyokimyasal ölçüm sonuçları

Demografik Özellik ve Analit Düzeyleri		Kontrol Grubu (n=50)	NAlb Hasta Grubu (n=51)	MikAlb Hasta Grubu (n=25)	MakAlb Hasta Grubu (n=24)
Yaş (yıl)		58 (45-63,5)	60 (50-66)	64 (53,5-72)	57,5 (49,2-66)
Cinsiyet	Erkek	n= 24 (% 48)	n= 18 (% 35)	n= 12 (% 48)	n= 16 (% 67)
	Kadın	n= 26 (% 52)	n= 33 (% 65)	n= 13 (% 52)	n= 8 (% 33)
Sigara	Kullanan	0 (% 0)	5 (% 10)	4 (% 16)	3 (% 12,5)
	Kullanmayan	50 (% 100)	46 (% 90)	21 (% 84)	21 (% 87,5)
Alkol	Kullanan	0 (% 0)	4 (% 8)	2(% 8)	3(% 12,5)
	Kullanmayan	50 (% 100)	47 (% 92)	23 (% 92)	21 (% 87,5)
Ailede Diyabet Hikayesi	Var	20 (% 40)	37 (% 72,5)	19 (% 76)	15 (%62,5)
	Yok	30 (% 60)	14 (% 27,5)	6 (% 24)	9 (37,5)
Diyabet Süresi (yıl)		-	10 (5-15)	20 (4-20)	13,5 (10-19,5)
VKI (kg/m <sup>2</sup> )		25,3 (23,1-28,5)	31,2 (28,2-34,7)	30,6 (27,7-35,3)	28,9 (26,5-31,6)
SKB (mmHg)		120 (110-120)	125 (120-140)	130 (120-142,5)	130 (120-150)
DKB (mmHg)		80 (70-80)	75 (65-80)	80 (70-80)	77,5 (70-80)
Glukoz (mmol/L)		5,3 (5-5,7)	8,3 (6,9-10,1)	8,4 (6,1-13,1)	9,3 (6,6-15,3)
T.Kolesterol (mmol/L)		4,9 ± 0,9 (2,5-7,6)	5,1 ± 0,8 (3,4-6,9)	4,9 ± 1,1 (2,8-7)	5,2 ± 1,1 (3,4-8,2)
HDL-Kol. (mmol/L)		1,2 (1-1,5)	1,1 (1-1,4)	1 ± 0,4 (0,8-1,5)	0,9 (0,8-1,3)
LDL-Kol. (mmol/L)		2,9 ± 0,8 (0,9-5,8)	3 ± 0,7 (1,4-4,7)	2,8 ± 1 (1-4,4)	3 ± 1 (1,3 ± 5,5)
Trigliserit (mmol/L)		1,2 (0,8-1,8)	1,8 (1,4-2,4)	2 (1,2-2,6)	2,1 (1,4-3,4)
Sistatin C (mg/L)		0,8 (0,7-0,9)	0,9 (0,8-1,1)	1,4 (1-1,8)	2,1 (1,6-3,4)
S. Kreatinini (µmol/L)		70 (58-80,5)	65 (56-77)	88 (71-119,5)	140 (99,2-226,2)
Albumin (g/L)		46 (44,7-44,7)	45,3 (43,2-47)	43,7 (41,8-47,5)	40,9 (36,1-44,3)
Mikroalbumin (mg/gün)		4,5 (3,2-5,9)	4,9 (3-8,7)	77,2 (46,1-162,6)	981 (502-1720)
HbA1c (mmol/mol)		38 (31,46)	61 (36-41)	58 (50-74)	65 (50-84)
Kreatinin Klirensi (mL/dk)		81,1 (68,2-114,8)	95,6 (75,1-112,2)	57,7 (41,6-113,2)	43,7 (18,3-69,4)
CKD-EPI-kre eGFR (mL/dk/1,73 m <sup>2</sup> )		93,5 (87,7-102,5)	97 (85-104)	72 (47,5-90,5)	44,5 (23,5-74,7)
MDRD eGFR (mL/dk/1,73 m <sup>2</sup> )		88,5 (79-99)	90 (79-101)	71 (47,5-85)	43 (22,7-70)
CKD-EPI-sis C eGFR (mL/dk/1,73 m <sup>2</sup> )		91,5 (81,5-101,2)	78 (62-89)	48 (33-76,5)	27 (14,2-40,2)

\*Sonuçlar normal dağılım gösteren parametrelerde ortalama ± standart sapma ve minimum-maksimum, normal dağılım göstermeyen parametrelerde ise ortanca ve 1.- 3. çeyreklik olarak gösterilmiştir.

Gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak değerlendirme sonuçları Tablo 17’de gösterilmektedir.

**Tablo 17.** Kontrol grubu ve diyabetik grupların farklılıklarının dağılımı

	NAIb		MikAlb		MakAlb	
<b>Kontrol</b>	SKB VKİ HbA1c Glukoz Trigliserit Sistatin C CKD-EPI-sisC	p=0,003 p=0,0001 p=0,0001 p=0,0001 p=0,001 p=0,041 p=0,032	SKB VKİ HbA1c Glukoz Trigliserit Sistatin C S. kreatinin CKD-EPI-kre MDRD CKD-EPI-sisC	p=0,002 p=0,004 p=0,0001 p=0,0001 p=0,021 p=0,0001 P=0,043 p=0,004 P=0,013 P=0,0001	SKB HbA1c Glukoz Trigliserit Sistatin C S.kreatinin S.albumin CKD-EPI-kre MDRD CKD-EPI-sisC Kre. Klirensi	p=0,0001 p=0,0001 p=0,0001 p=0,001 p=0,0001 p=0,0001 p=0,0001 p=0,0001 p=0,0001 p=0,0001 p=0,001
<b>NAIb</b>			S.kreatinin Sistatin C CKD-EPI-kre MDRD CKD-EPI-sisC	p=0,006 p=0,024 p=0,004 p=0,01 p=0,027	S.kreatinin S.albumin Sistatin C CKD-EPI-kre CKD-EPI-sis C MDRD Kre. Klirensi	p=0,0001 p=0,001 p=0,0001 p=0,0001 p=0,0001 p=0,0001 p=0,0001
<b>MikAlb</b>					Sistatin C S.kreatinin CKD-EPI-kre MDRD CKD-EPI-sisC Kre. Klirensi	p=0,04 p=0,03 p=0,148 p=0,096 p=0,052 p=0,50

Tablo 16 ve Tablo 17’de gözlendiği gibi gruplar arasında cinsiyet, yaş ve diyastolik kan basıncı arasında anlamlı fark bulunmadı.

Biyokimyasal ölçümlerden total kolesterol, LDL-kolesterol ve HDL-kolesterol düzeylerinde de gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu.

Sigara kullanımı açısından tüm gruplarda sigara kullanmayanların yüzdeleri %84-%100; alkol kullanmayanların yüzdeleri %87,5-%100 arasında idi. Ailelerinde diyabet öyküsünün varlığı kontrol grubunda %40, diyabetik grupta %62,5 ve %76 arasında değişmektedir.

Vücut kütle indeksleri, NAIb ve MikAlb gruplarında kontrol grubundan sırasıyla p=0,0001 ve p=0,004 düzeylerinde anlamlı yüksek bulundu.

Sistolik kan basınçları: NAlb, Mik ve MakAlb gruplarında kontrol grubundan sırasıyla  $p=0,003$ ,  $p=0,002$  ve  $p=0,0001$  düzeylerinde anlamlı yüksek bulundu.

Glukoz düzeyleri tüm diyabetik grupta kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek (NAlb:  $p=0,0001$ , MikAlb:  $p=0,0001$  ve MakAlb:  $p=0,0001$ ) bulunurken diyabetik gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmadı.

HbA1c düzeyleri tüm diyabetik grupta kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek (NAlb:  $p=0,0001$ , MikAlb:  $p=0,0001$  ve MakAlb:  $p=0,0001$ ) bulunurken diyabetik gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmadı.

Lipitlerden trigliseritler tüm diyabetik grupta kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek (NAlb:  $p=0,001$ , MikAlb:  $p=0,021$  ve MakAlb:  $p=0,001$ ) bulunurken diyabetik gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmadı.

Serum albumin düzeyi yalnız MakAlb grubunda kontrol grubundan  $p=0,0001$  düzeyinde anlamlı derecede düşük bulundu.

Serum kreatinin düzeyi MakAlb grubunda kontrol grubundan  $p=0,0001$ : MikAlb grubu NAlb grubundan  $p=0,006$  düzeylerinde anlamlı derecede yüksek bulundu.

Kreatinin klirens düzeyleri diyabetik gruplardan MakAlb grup hem kontrol ( $p=0,001$ ) hem de NAlb ( $p=0,0001$ ) gruplardan anlamlı derecede düşük bulundu.

Hesaplanan GFR'ler arasında sistatin C'ye göre hesaplanan düzeyler kontrol grubundan tüm diyabetik grupta (NAlb:  $p= 0,032$ , MikAlb:  $p=0,0001$ , MakAlb:  $p=0,0001$ ) anlamlı derecede düşük bulundu.

### **miRNA Analiz Sonuçları**

Kontrol grubu ve diyabetik grupların miRNA göreceli ekspresyon değerleri ( $2^{-\Delta Ct}$ ) Tablo 18'de ve göreceli ekspresyon oranları (kat değişimi,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) Tablo 19'da gözlenmektedir.

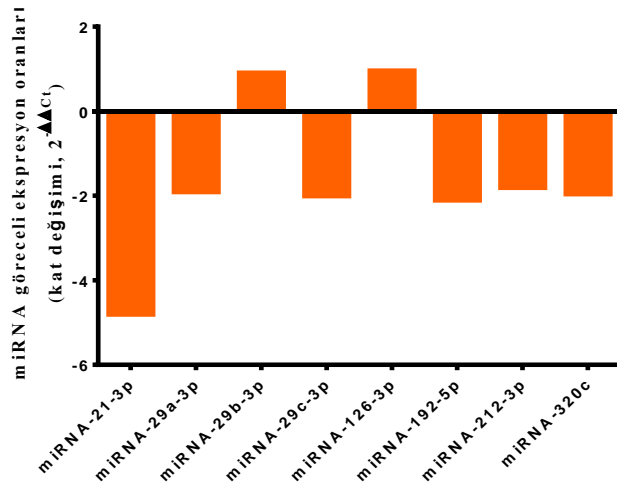
**Tablo 18.** Kontrol grubunun ve diyabetik grupların miRNA göreceli ekspresyon ( $2^{-\Delta Ct}$ ) değerleri

		<b>Kontrol (n=50)</b>	<b>NAIb (n=51)</b>	<b>MikAlb (n=25)</b>	<b>MakAlb (n=24)</b>
<b>miRNA-21-3p</b>	<b>n</b>	26	21	14	20
	<b>Ortanca</b>	0,62	0,16	0,14	0,09
	<b>1. ve 3. Çeyreklik</b>	0,11-2,03	0,05-0,51	0,04-0,76	0,04-0,15
<b>miRNA-29a-3p</b>	<b>n</b>	50	51	25	24
	<b>Ortanca</b>	10,38	6,77	4,14	4,75
	<b>1. ve 3. çeyreklik</b>	1,51-28,8	1,24-25,63	1,07-15,68	2,51-8,89
<b>miRNA-29b-3p</b>	<b>n</b>	50	51	25	24
	<b>Ortanca</b>	2,06	2,66	1,82	2,44
	<b>1. ve 3. çeyreklik</b>	0,60-29,98	0,40-11,87	0,37-6,88	0,53-5,56
<b>miRNA-29c-3p</b>	<b>n</b>	50	51	25	24
	<b>Ortanca</b>	35,76	16	13,55	19,89
	<b>1. ve 3. çeyreklik</b>	5,21-188,38	2,90-75,58	2,55-65,89	5,13-34,67
<b>miRNA-126-3p</b>	<b>n</b>	50	51	25	24
	<b>Ortanca</b>	77,46	107,64	71,51	46,63
	<b>1. ve 3. çeyreklik</b>	33,65- 287,06	39,12- 424,61	19,95- 221,25	17,54- 145,15
<b>miRNA-129-1-3p</b>	<b>n</b>	12	5	4	5
	<b>Ortanca</b>	0,01	0,01	<0,01	<0,01
	<b>1. ve 3. çeyreklik</b>	<0,01-0,11	<0,01-0,09	<0,01-0,01	<0,01-0,01
<b>miRNA-137</b>	<b>n</b>	8	8	6	2
	<b>Ortanca</b>	0,03	0,01	<0,01	<0,01
	<b>1. ve 3. çeyreklik</b>	<0,01-0,13	<0,01-0,04	<0,01-0,01	<0,01-0,01
<b>miRNA-192-5p</b>	<b>n</b>	50	51	25	24
	<b>Ortanca</b>	23,22	14,42	7,41	10,23
	<b>1. ve 3. çeyreklik</b>	7,04-112,44	4,53-63,55	2,1-35,65	3,24-20,05
<b>miRNA-212-3p</b>	<b>n</b>	26	20	11	14
	<b>Ortanca</b>	0,04	0,04	0,01	0,02
	<b>1. ve 3. çeyreklik</b>	<0,01-0,12	<0,01-0,06	<0,01-0,03	<0,01-0,03
<b>miRNA-320c</b>	<b>n</b>	50	51	25	24
	<b>Ortanca</b>	10,68	4,93	5,78	7,25
	<b>1. ve 3. çeyreklik</b>	2,78-38,19	2,17-20,39	1,67-23,7	1,85-10,42



Çalışma grubunda miRNA göreceli ekspresyon değerleri saptanabilmiş kontrol ve diyabetik gruptaki birey sayıları Tablo 18’de gözlenmektedir. miRNA-129-3p ve miRNA-137 ekspresyon düzeyleri çalışma grubunun sayısı yeterli olmadığından istatistiksel olarak değerlendirmeye alınmadı.

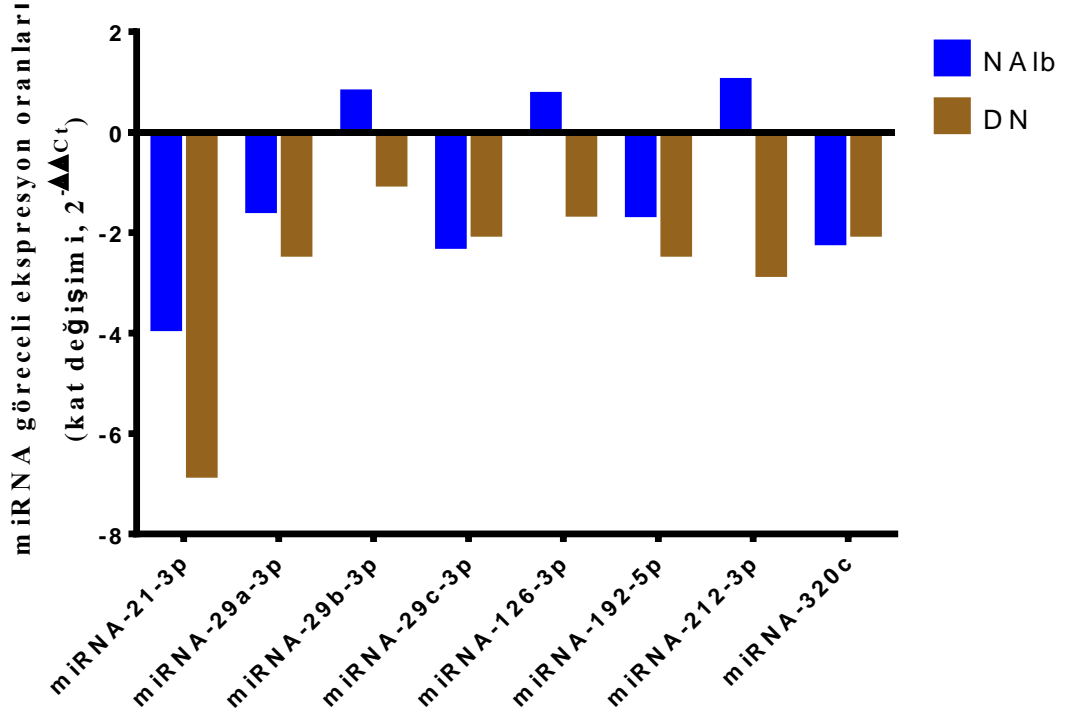
miRNA göreceli ekspresyonlarının karşılaştırılmasında, tüm diyabetik hastalarda kontrollere göre; miRNA-21-3p’de 5 kat azalma ( $p=0,004$ ), miRNA-29a-3p’de 2 kat azalma ( $p=0,198$ ), miRNA-29b-3p’de 1 kat artma ( $p=0,296$ ), miRNA-29c-3p’de 2 kat azalma ( $p=0,160$ ), miRNA-126-3p’de 1 kat artma ( $p=0,862$ ), miRNA-192-5p’de 2 kat azalma ( $p=0,029$ ), miRNA212-3p’de 2 kata yakın azalma ( $p=0,182$ ) ve miRNA-320c’de 2 kat azalma ( $p=0,080$ ) saptandı. Tüm diyabetik hastaların kontrollerle karşılaştırıldığı kat değişim grafiği Şekil 6’da gösterilmektedir.



**Şekil 6.** Tüm diyabetik hastaların miRNA göreceli ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişim oranları (kat değişimi,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )

miRNA göreceli ekspresyonlarının karşılaştırılmasında DN grubunda kontrollere göre miRNA-21-3p’de 7 kat azalma ( $p=0,003$ ), miRNA-29a-3p’de 2,4 kat azalma ( $p=0,130$ ), miRNA-29b-3p’de 1 kat azalma ( $p=0,238$ ), miRNA-29c-3p’de 2 kat azalma ( $p=0,112$ ), miRNA-126-3p’de 1,5 kat azalma ( $p=0,226$ ), miRNA-192-5p’de 2,4 kat azalma ( $p=0,027$ ), miRNA212-3p’de 3 kat azalma ( $p=0,057$ ) ve

miRNA-320c’de 2 kata yakın azalma (p=0,071) saptandı. Diyabetik nefropatinin kontrollerle karşılaştırıldığı kat genişim grafiği Şekil 7’de gösterilmektedir.



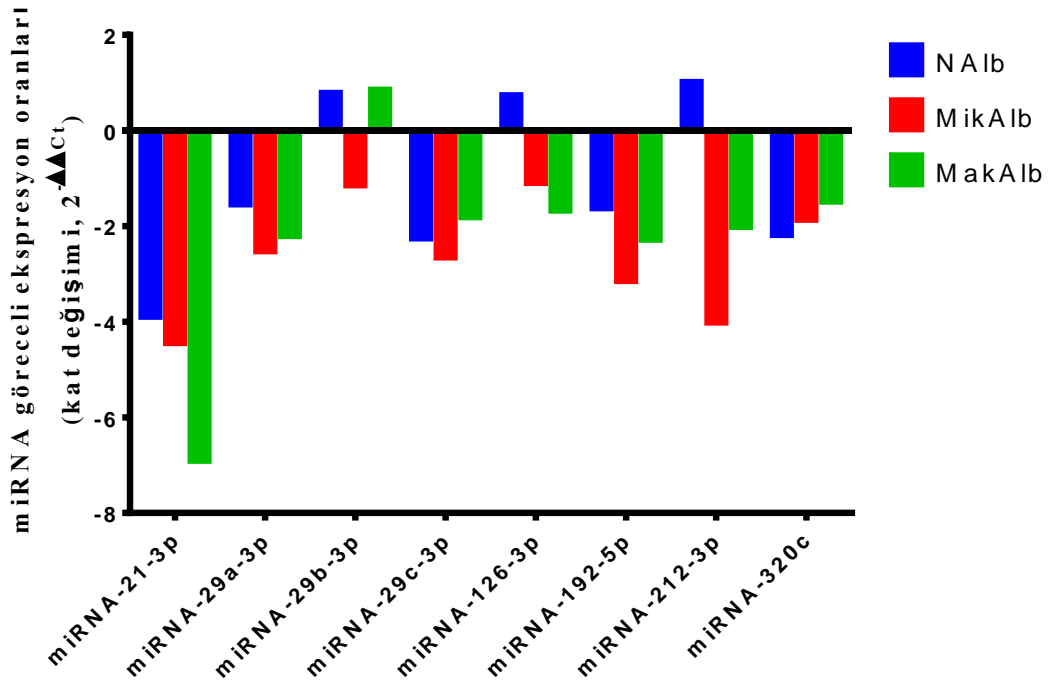
Şekil 7. Diyabetik nefropatili hastaların miRNA göreceli ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişim oranları (kat değişimi, 2<sup>-ΔΔCt</sup>)

miRNA göreceli ekspresyonlarının diyabetik alt gruplarda birbirleriyle ve kontrollerle kat değişimleri Tablo 19’da gözlenmektedir. Diyabetik alt grupların kontrollerle karşılaştırıldığı kat değişim grafiği ise Şekil 8’de gösterilmektedir.

**Tablo 19.** Kontrol grubu ve diyabetik gruplarının miRNA göreceli ekspresyon değerlerinin birbirine oranları (kat değişimi,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )

miRNA Tipi		NAIb	Mik Alb	MakAlb
miRNA-21-3p	Kontrol	3,97	4,54	6,60
	NAIb		1,14	2,23
	MikAlb			1,66
miRNA-29a-3p	Kontrol	1,53	2,51	2,19
	NAIb		1,64	1,43
	MikAlb			0,87
miRNA-29b-3p	Kontrol	0,77	1,13	0,84
	NAIb		1,46	1,09
	MikAlb			0,74
miRNA-29c-3p	Kontrol	2,23	2,64	1,80
	NAIb		1,18	0,80
	MikAlb			0,68
miRNA-126-3p	Kontrol	0,72	1,08	1,66
	NAIb		1,51	2,31
	MikAlb			1,53
miRNA-192-5p	Kontrol	1,61	3,13	2,27
	NAIb		1,95	1,41
	MikAlb			0,72
miRNA-212-3p	Kontrol	1,04	5,06	2,31
	NAIb		2	4,88
	MikAlb			0,46
miRNA-320c	Kontrol	2,17	1,85	1,47
	NAIb		0,85	0,68
	MikAlb			0,80

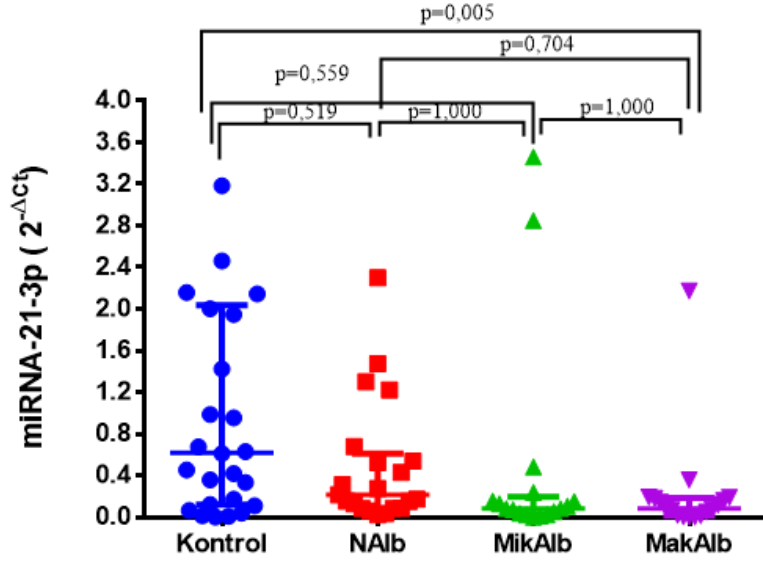
\*Oranlar satırdaki grupların  $2^{-\Delta C_t}$  değerleri/sütundaki grupların  $2^{-\Delta C_t}$  değerleri şeklinde verilmiştir. Sütunda yer alan grupların kat değişimi  $>1$  ise satırdaki gruplara göre azalma,  $<1$  ise satırdaki gruplara göre artma olduğu yönünde değerlendirilmelidir.



Şekil 8. Diyabetik alt grupların miRNA göreceli ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişim oranları (kat değişimi,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

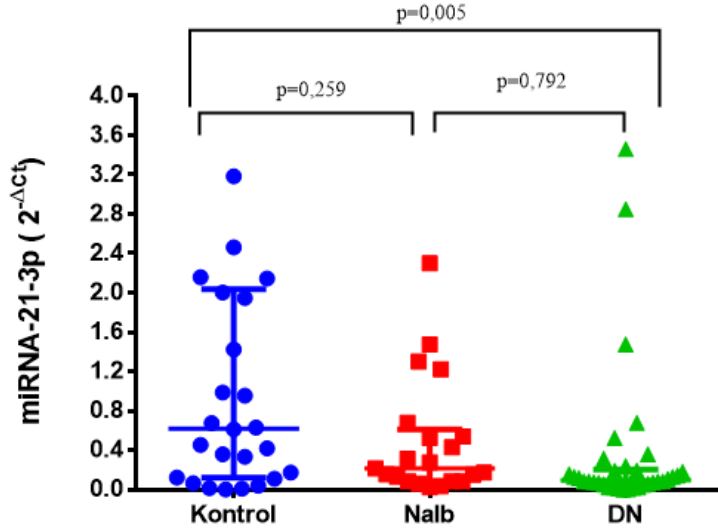
*miRNA-21-3p* göreceli ekspresyon değerlerinde kontrol grubuyla diyabetik gruplar (NAlb:  $p=0,519$ , MikAlb:  $p=0,559$ ) arasında anlamlı fark gözlenmezken MakAlb ile kontrol grubu arasında ( $p=0,005$ ) anlamlı fark bulundu ve Şekil 9’da da görüldüğü gibi azaldığı (7 kat) gözlenmektedir.

*miRNA-21-3p* göreceli ekspresyon değerlerinde diyabetik grupların kendi arasında anlamlı fark bulunmadı (MikAlb-NAlb:  $p=1,000$ , MakAlb-NAlb  $p=0,704$ , MakAlb-MikAlb:  $p=1,000$ ).



Şekil 9. Kontrol grubu ve diyabetik grupların miRNA-21-3p göreceli ekspresyon değerleri (Kontrol grubunda bir değer aşırı uç olduğu için grafikte gösterilmemiştir.)

Mikroalbuminürik ve makroalbuminürik gruplar nefropatili hastalardan oluşturulduğu için çalışma grubu kontrol, normoalbuminürik diyabetikler ve nefropatili diyabetikler (DN) olarak üç grup değerlendirildiğinde bu grupların miRNA-21-3p göreceli ekspresyon düzeyleri ortancaları arasında farklılık gözlenmektedir. miRNA-21-3p göreceli ekspresyon değerlerinde kontrole göre NA1b'de (p=0,519) ve DN ile NA1b'de (p=0,792) anlamlı fark yokken DN'lerde hem azalma (7kat) hem de p=0,005 düzeyindeki anlamlı fark Şekil 10'da gösterilmektedir.



**Şekil 10.** Kontrol grubu, normoalbuminürik diyabetik (NAlb) ve diyabetik nefropatili (DN) hastaların miRNA-21-3p göreceli ekspresyon değerleri (Kontrol grubunda bir değer aşırı uç olduğu için grafikte gösterilmemiştir.)

*miRNA-29a-3p* göreceli ekspresyon düzeyleri kontrol ile tüm diyabetik gruplar arasında ve tüm diyabetik grupların kendi arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,533$ ).

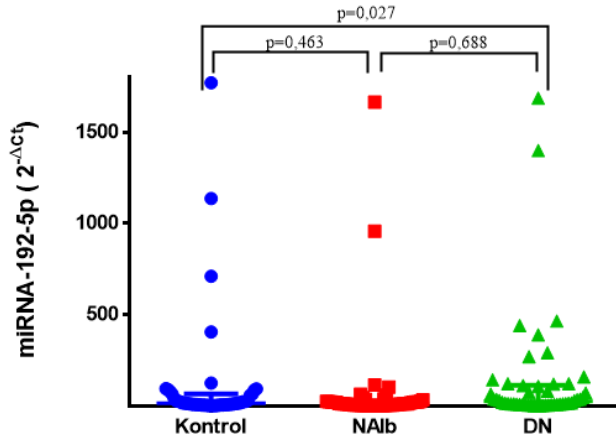
*miRNA-29b-3p* göreceli ekspresyon düzeyleri kontrol ile tüm diyabetik gruplar arasında ve tüm diyabetik grupların kendi arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,685$ ).

*miRNA-29c-3p* göreceli ekspresyon düzeyleri kontrol ile tüm diyabetik gruplar arasında ve tüm diyabetik grupların kendi arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,510$ ).

*miRNA-126-3p* göreceli ekspresyon düzeyleri kontrol ile tüm diyabetik gruplar arasında ve tüm diyabetik grupların kendi arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,166$ ).

*miRNA-192-5p* göreceli ekspresyon düzeyleri kontrol ile tüm diyabetik alt gruplar arasında ve tüm bu diyabetik grupların kendi arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,078$ ).

Mikroalbuminürik ve makroalbuminürik gruplar nefropatili hastalardan oluşturulduğu için çalışma grubu kontrol ve normoalbuminürik diyabetikler ve nefropatili diyabetikler (DN) olarak üç grup olarak değerlendirildiğinde Tablo 18’de bu grupların miRNA-192-5p göreceli ekspresyon düzeyleri ortancaları arasındaki farklılık gözlenmektedir. Kontrol ile NAlb’de ( $p=0,463$ ) ve DN ile NAlb’de ( $p=0,688$ ) anlamlı fark yokken Şekil 11’de DN’lerde hem azalma (2,4 kat) hem de  $p=0,027$  düzeyinde anlamlı fark gösterilmektedir.



**Şekil 11.** Kontrol grubu, normoalbuminürik diyabetik (NAlb) ve diyabetik nefropatili (DN) hastaların miRNA-192-5p göreceli ekspresyon değerleri (NAlb grubunda bir değer aşırı uç olduğu için grafikte gösterilmemiştir.)

*miRNA-212-3p* göreceli ekspresyon düzeyleri kontrol ile tüm diyabetik gruplar arasında ve tüm diyabetik grupların kendi arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,245$ ).

*miRNA-320c* göreceli ekspresyon düzeyleri kontrol ile tüm diyabetik gruplar arasında ve tüm diyabetik grupların kendi arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,281$ ).

### **miRNA'lar İle Biyokimyasal Ölçümler Arasındaki İlişki**

Tüm bireylerin miRNA-21-3p ile miRNA-192-5p göreceli ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde *miRNA-21-3p* ile *miRNA-192-5p* göreceli

ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı pozitif yönde orta derecede korelasyon bulundu ( $r=0,512$ ,  $p=0,0001$ ).

Tüm bireylerin HbA1c ile miRNA göreceli ekspresyon düzeyleri arasında ilişki değerlendirildiğinde HbA1c ile *miRNA-21-3p* göreceli ekspresyon düzeyi arasında anlamlı pozitif yönde düşük korelasyon bulunurken ( $r=0,274$ ,  $p=0,013$ ); *miRNA-29a-3p* ( $r=0,061$ ,  $p=0,455$ ), *miRNA-29b-3p* ( $r=0,037$ ,  $p=0,654$ ), *miRNA-29c-3p* ( $r=0,024$ ,  $p=0,769$ ), *miRNA-126-3p* ( $r=0,051$ ,  $p=0,533$ ), *miRNA-192-5p* ( $r=0,060$ ,  $p=0,468$ ), *miRNA-212-3p* ( $r=0,080$ ,  $p=0,509$ ) ve *miRNA-320c* ( $r=0,049$ ,  $p=0,549$ ) göreceli ekspresyon düzeyleri ile arasında anlamlı korelasyon bulunmadı.

Tüm bireylerin göreceli miRNA ekspresyon düzeyleri ile 24 saatlik idrarda mikroalbumin, kreatinin klirensi ve eGFRler (CKD-EPI-kre, MDRD, CKD-EPI-sis C) arasındaki ilişki değerlendirildi. Tüm bireylerin 24 saatlik idrarda mikroalbumin, kreatinin klirensi ve eGFR (CKD-EPI-kre, CKD-EPI-sis C, MDRD) ile göreceli miRNA ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki ( $r$  ve  $p$  değerleri) Tablo 20’de gösterilmektedir.

**Tablo 20.** miRNA göreceli ekspresyon düzeyleri ile 24 saatlik idrarda mikroalbumin, kreatinin klirensi ve eGFRler (CKD-EPI-kre, CKD-EPI-sis C, MDRD) arasındaki ilişki

		miRNA 21-3p	miRNA 29a-3p	miRNA 29b 3p	miRNA 29c-3p	miRNA 126-3p	miRNA 192-5p	miRNA 212-3p	miRNA 320c
<b>Mikroalbumin (mg/gün)</b>	r	-0,323	-0,130	-0,154	-0,173	-0,228	-0,267	-0,172	-0,175
	p	<b>0,003*</b>	0,112	0,060	<b>0,034*</b>	<b>0,005*</b>	<b>0,001*</b>	0,152	<b>0,032*</b>
<b>Kreatinin Klirensi (mL/dk)</b>	r	0,121	0,045	0,038	0,094	0,078	0,055	0,090	0,018
	p	0,284	0,587	0,645	0,251	0,342	0,503	0,455	0,828
<b>CKD-EPI-kre (mL/dk/1,73m<sup>2</sup>)</b>	r	0,191	0,053	0,107	0,144	0,093	0,185	0,057	0,120
	p	0,088	0,522	0,193	0,080	0,256	<b>0,023*</b>	0,637	0,142
<b>MDRD (mL/dk/1,73m<sup>2</sup>)</b>	r	0,243	0,099	0,145	0,188	0,145	0,223	0,107	0,126
	p	<b>0,029*</b>	0,227	0,076	<b>0,021*</b>	0,076	0,06	0,375	0,124
<b>CKD-EPI- sisC (mL/dk/1,73m<sup>2</sup>)</b>	r	0,262	0,079	0,030	0,131	0,417	0,203	0,085	0,142
	p	<b>0,018*</b>	0,336	0,716	0,110	<b>0,034*</b>	<b>0,013*</b>	0,479	0,083

\* $p<0,05$  olup aralarında anlamlı korelasyon vardır.

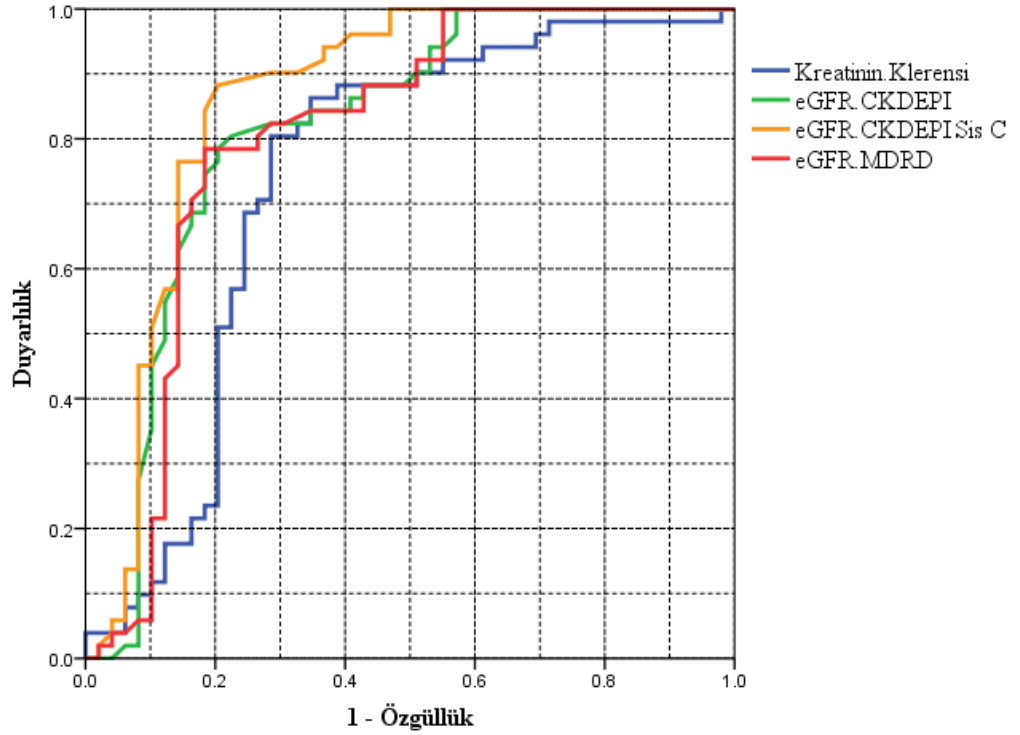


*miRNA-21-3p* göreceli ekspresyon düzeyi ile mikroalbumin arasında anlamlı negatif yönde düşük korelasyon ( $r=-0,323$ ,  $p=0,003$ ), MDRD eGFR ile anlamlı pozitif yönde düşük korelasyon ( $r=0,243$ ,  $p=0,029$ ), CKD-EPI-sis C eGFR ile anlamlı pozitif yönde düşük korelasyon ( $r=0,262$ ,  $p=0,018$ ) bulundu. *miRNA-29c-3p* göreceli ekspresyon düzeyi ile mikroalbumin arasında anlamlı negatif yönde düşük korelasyon ( $r=-0,173$ ,  $p=0,034$ ), MDRD eGFR ile anlamlı pozitif yönde düşük korelasyon ( $r=0,188$ ,  $p=0,021$ ) bulundu. *miRNA-126-3p* göreceli ekspresyon düzeyi ile mikroalbumin arasında anlamlı negatif yönde düşük korelasyon ( $r=-0,228$ ,  $p=0,005$ ), CKD-EPI-sis C eGFR ile anlamlı pozitif zayıf korelasyon ( $r=0,417$ ,  $p=0,034$ ) bulundu. *miRNA-192-5p* göreceli ekspresyon düzeyi ile mikroalbumin arasında anlamlı negatif yönde düşük korelasyon ( $r=-0,267$ ,  $p=0,001$ ), CKD-EPI-kre eGFR ile anlamlı pozitif yönde düşük korelasyon ( $r=0,185$ ,  $p=0,023$ ), CKD-EPI-sis C eGFR ile anlamlı pozitif yönde düşük korelasyon ( $r=0,203$ ,  $p=0,013$ ) bulundu. *miRNA-320c* göreceli ekspresyon düzeyi ile mikroalbumin arasında anlamlı negatif yönde düşük korelasyon ( $r=-0,175$ ,  $p=0,032$ ) bulundu.

#### **Diyabetik Nefropati Tanısında miRNA Göreceli Ekspresyon Düzeylerinin Biyokimyasal Hesaplamalar İle Karşılaştırılması**

Diyabetik nefropatili hastalar ile diyabetik normoalbuminürik hastaları ayırmada kreatinin klirensi ve eGFR (CKD-EPI-kre, MDRD ve CKD-EPI-sis C) hesaplamalarının kullanılabilirliğini değerlendirmek ve birbiriyle karşılaştırmak için ROC analizi yapıldı.

Diyabetik nefropatili hastalar ile diyabetik normoalbuminürik hastaları ayırmada kreatinin klirensi, CKD-EPI-kre, MDRD, CKD-EPI-sis C eGFR hesaplamalarına ait ROC eğrileri Şekil 12’de gösterilmektedir.



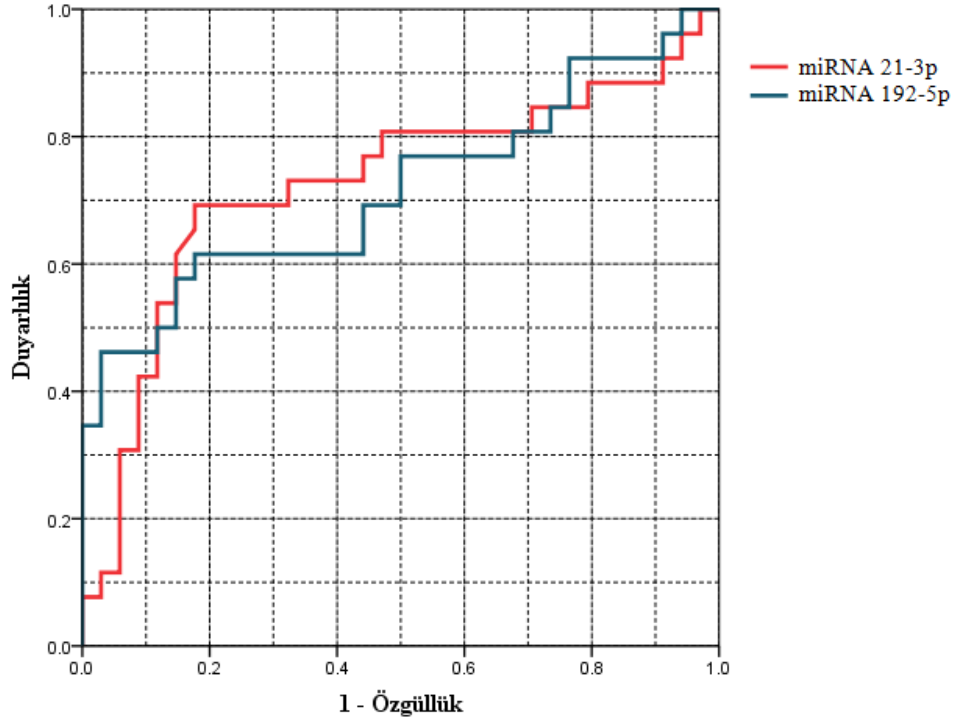
**Şekil 12.** Diyabetik nefropatili hastalar ile diyabetik normoalbuminürik hastaları ayırmada kreatinin klirensi, CKD-EPI-kre, MDRD, CKD-EPI-sis C eGFR hesaplamalarına ait ROC eğrileri

Diyabetik nefropatili hastalar ile diyabetik normoalbuminürik hastaları ayırmada kreatinin klirensi, CKD-EPI-kre, MDRD ve CKD-EPI-sis C eGFR hesaplamalarına ait eğri altında kalan alan (Area Under Curve=AUC) ve p değeri Tablo 21’de gösterilmektedir.

**Tablo 21.** Diyabetik nefropatili hastalar ile diyabetik normoalbuminürik hastaları ayırmada kreatinin klirensi, CKD-EPI-kre, MDRD ve CKD-EPI-sis C eGFR hesaplamalarına ait AUC ve p değerleri

	Kişi sayısı (n)	AUC (%95 Güven Aralığı)	p değeri
<b>Kreatinin klirensi</b>	150	0,738 (0,634-0,843)	0,0001
<b>CKD-EPI-kreatinin eGFR</b>	150	0,814 (0,725-0,904)	0,0001
<b>MDRD eGFR</b>	150	0,804 (0,711-0,897)	0,0001
<b>CKD-EPI-sistatin C eGFR</b>	150	0,860 (0,780-0,941)	0,0001

Diyabetik nefropatili (MikAlb+MakAlb) hastalar ile kontrol grubunu ayırmada miRNA 21-3p ve miRNA 192-5p göreceli ekspresyon düzeylerine ait ROC grafikleri Şekil 13'te gösterilmektedir.



**Şekil 13.** Diyabetik nefropatili hastalar ile kontrol grubunu ayırmada miRNA 21-3p ve miRNA 192-5p göreceli ekspresyon düzeylerine ait ROC grafikleri

Diyabetik nefropatili hastalar ile kontrol grubunu ayırmada miRNA 21-3p ve miRNA 192-5p göreceli ekspresyon düzeylerine ait AUC ve p değerleri Tablo 22'de gösterilmektedir.

**Tablo 22.** Diyabetik nefropatili hastalar ve kontrol grubu ayırımında miRNA 21-3p ve miRNA 192-5p göreceli ekspresyon düzeylerine ait AUC ve p değerleri

	Kişi sayısı (n)	AUC (%95 Güven Aralığı)	p değeri
<b>miRNA-21-3p</b>	81	0,726 (0,586-0,866)	0,003
<b>miRNA-192-5p</b>	150	0,717 (0,578-0,856)	0,004

## TARTIŞMA

Çalışmamızda insanda diyabetik nefropati ile ilişkisi bulunduğu gösterilmekte olan miRNA-21a-3p, miRNA-29a-3p, miRNA-29b-3p, miRNA-29c-3p, miRNA-126-3p, miRNA-192-5p, miRNA-320c (7,11,12,13,14,15) ve farelerde çalışılmış olan diyabetle ilişkisi olduğu düşünülen miRNA-129-1-3p, miRNA-137, miRNA-212-3p'nin (16,88) plazmadaki durumları değerlendirildi.

Renal fonksiyonun dolaşımdaki ve idrardaki miRNA'lara etkisi ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır ve zıt bulgular elde edilmektedir (98). Şiddetli böbrek hastalıklarında dolaşımdaki miRNA'larda düşüş gözlenmektedir (99-101). Diyabette ve diyabetin komplikasyonlarıyla ilgili çalışmaların bulguları da farklılık göstermektedir (8,88,98,99).

Tek miRNA'nın farklı dokulardan salınması ve çoklu etkisinin bulunması klinik açıdan önemli olan bu nükleotidlerin belirli bozukluk ya da hastalıklarda klinik yararlanım için kullanılmasında zorlayıcı olmaktadır. Bu özellikler dikkate alınarak her miRNA etki mekanizmalarına ve diğer araştırma sonuçlarına göre karşılaştırılmaktadır.

Çalışmamızda plazmalarında *miRNA-21* saptanabilen birey oranları (saptanan/çalışılan) kontrol grubunda 26/50; NAlb'de 21/51; MikAlb'de 14/25; MakAlb'de 20/24 idi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda kontrollere göre diyabetiklerde 5 kat azalma ( $p=0,004$ ); NAlb'de 4 kat ( $p=0,519$ ) ve DN grubunda 7 kat azalma ( $p=0,003$ ); MikAlb'de 5 kat azalma ( $p=0,559$ ); MakAlb'de 7 kat azalma ( $p=0,005$ ) gözlemlendi. miRNA-21; MDRD ( $r=0,243$ ,  $p=0,029$ ) ve sistatin C'ye göre eGFR ( $r=0,262$ ,  $p=0,018$ ) pozitif, anlamlı korelasyon gösterdi. miRNA-21 mikroalbuminüri ile negatif, anlamlı korelasyon gösterdi ( $r=-0,323$ ,  $p=0,003$ ). miRNA-21 HbA1c ile negatif, anlamlı korelasyon gösterdi ( $r=-0,274$ ,  $p=0,013$ ).

Bulgularımız Neal ve ark.'nın (99) ve Anna Zampetaki ve ark. (102) çalışmalarının bulgularıyla uyumlu olsa da miRNA-21'in plazmadaki düzeyiyle ilgili klinik yararlılık için daha ayrıntılı çalışmalar gerektiği gözlenmektedir.

Serumda miRNA-21 düzeyinin bakıldığı diyabetik nefropatili hastalarda diyabetik normoalbuminürik hastalara göre miRNA-21 düzeyinin arttığı tespit edilmiştir (103). Kronik böbrek hastalarının plazmasında miRNA-21 düzeyinin bakıldığı başka bir çalışmada ise normal hastalara göre 4 kat azaldığı saptanmıştır (99). Bu çalışmada miRNA-21 ile birlikte diğer miRNA'ların da azalması (miRNA-16, miRNA-155, miRNA-210 and miRNA-638) böbrek yetmezliğinde artış gösteren ribonükleazlar nedeniyle olabilir (104).

miRNA-21 ilk tanımlanan miRNA'lardan birisi olup ekspresyon artışı ve azalışı pek çok kanser ve kardiyovasküler hastalıkla ilişkilendirilmektedir (105). miRNA-21 diyabet komplikasyonları ve böbrek hastalıkları açısından klinik anlamlığı ve terapötik kullanımı en fazla araştırılan miRNA'lardandır (88,99,106-111).

Tip 2 diyabetin komplikasyonlarında rol oynayan miRNA-21'in moleküler mekanizması deneysel, hücre kültürü ve biyopsilerde yapılan çalışmalarla araştırılmaktadır (84,100,112). TGF- $\beta$  ailesi diyabetik nefropatide rol oynayan ana düzenleyicilerden birisidir (113,114). Çok sayıda miRNA'nın TGF- $\beta$  ile ilişkisi araştırılmaktadır (115). miRNA-21 ekspresyonu posttranskripsiyonel olarak TGF- $\beta$ 1 ile düzenlenmektedir. TGF- $\beta$ 1; SMAD ile ilişkili veya SMAD'dan bağımsız sinyal yollarıyla renal fibrozisi artırır. Diyabette yüksek glukoz seviyelerinin indüklediği TGF- $\beta$ 1'in uyardığı miRNA-21, SMAD3'ün aktivasyonunu inhibe eden SMAD7'i baskılar. SMAD7'nin baskılanması, *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) sinyal aracılığıyla da renal hasara yol açar (84,112,116). PTEN/AKT/TORC1 yolunda ise, yüksek kan glukozunun uyardığı fosfotidil inozitol 3,4,5 trifosfat (PIP3), PTEN tarafından defosforile edilerek AKT kinaz inaktive edilir (100). miRNA-21 artışı PTEN'i baskılayarak AKT/TORC1 sinyal yolunu aktive eder ve renal hasara yol açar (11). 3T3-L1 adipositlerde yaptıkları çalışmada, Ling ve ark. (117) insülin dirençli adipositlerde miRNA-21'in ekspresyonunun azaldığını, PTEN-AKT yolunun miRNA-21 maruziyetinden sonra olasılıkla etkilenerek insülin etki yolunu aktiflediklerini saptamışlardır. Oldukça farklı yollarla etkilerini göstermeleri mikroRNA'ların kullanım amaçlarına karar verilmesinde zorlayıcı olmaktadır.

Deneysel araştırmalarda ve renal dokuda yapılan çalışmalarda miRNA-21'in fazla ekspresyonu söz konusudur (100,108,118). Terapötik uygulamalar için bu bilgiler yararlı olabilecektir ancak dolaşımdaki miRNA-21 ile ilgili bulgular çelişkilidir.

İdrar analizlerinde gerçekleştiren çalışmalarda da zıt sonuçlar gözlenmektedir. Nefropatili hastaların idrar sediment analizinde miRNA-21 düzeyini araştıran çalışmada miRNA-21 düzeyi düşük bulunurken (12), nefropatili hastaların idrar sediment analizinde miRNA-21 yüksek çıkmıştır (119).

Serum, plazma ve idrarda yapılan çalışmalarda miRNA-21'in ekzosomlarda da taşınmasının mümkün olabileceği hesaba katılmalı ve bu yönde ek çalışmalar yapılmalıdır. Fakat ne yazık ki bu çalışmalar daha çok özen ve maliyet gerektirmektedir.

Çalışmamızda bakılan tüm miRNA'ların düzeyinin diyabetik nefropatili hastalarda düşük çıkması (Bkz. Şekil 7) ve özellikle miRNA-21'in MakAlb grupta düşük çıkması kronik böbrek hastalığında miRNA'ların yapımının yanısıra, yıkımı, böbreklerden atılımı ve proteinüri durumu ile ilgili bilinenin dışında ek mekanizmaların olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda plazmalarında *miRNA-29a* saptanabilen birey oranları (saptanan/çalışılan) kontrol grubunda 50/50; NAlb'de 51/51; MikAlb'de 25/25; MakAlb'de 24/24 idi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda kontrollere göre diyabetiklerde 2 kat azalma ( $p=0,198$ ); NAlb'de 1,5 kat azalma ( $p=0,469$ ) ve DN grubunda 2,4 kat azalma ( $p=0,130$ ); MikAlb'de 2,5 kat azalma ( $p=0,225$ ); MakAlb'de 2 kat azalma ( $p=0,210$ ) gözlendi. miRNA-29a eGFR değerleriyle anlamlı korelasyon göstermedi.

Çalışmamızda plazmalarında *miRNA-29b* saptanabilen birey oranları (saptanan/çalışılan) kontrol grubunda 50/50; NAlb'de 51/51; MikAlb'de 25/25; MakAlb'de 24/24 idi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda kontrollere göre diyabetiklerde 1 kat artma ( $p=0,296$ ); NAlb'de 1 kat artma ( $p=0,525$ ) ve DN grubunda 1 kat azalma ( $p=0,238$ ); MikAlb'de 1 kat azalma ( $p=0,252$ ); MakAlb'de 1

kat artma ( $p=0,443$ ) gözlemlendi. miRNA-29b eGFR değerleriyle anlamlı korelasyon göstermedi.

Çalışmamızda plazmalarında *miRNA-29c* saptanabilen birey oranları (saptanan/çalışılan) kontrol grubunda 50/50; NAlb'de 51/51; MikAlb'de 25/25; MakAlb'de 24/24 idi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda kontrollere göre diyabetiklerde 2 kat azalma ( $p=0,160$ ); NAlb'de 2 kat azalma ( $p=0,394$ ) ve DN grubunda 2 kat azalma ( $p=0,112$ ); MikAlb'de 3 kat azalma ( $p=0,208$ ); MakAlb'de 2 kat azalma ( $p=0,184$ ) gözlemlendi. miRNA-29c; MDRD eGFR ile ( $r=0,188$ ,  $p=0,021$ ) pozitif, anlamlı korelasyon gösterdi. miRNA-29c mikroalbumiüri ile negatif, anlamlı korelasyon gösterdi ( $r=-0,173$ ,  $p=0,034$ ).

Dolaşımdaki miRNA-29 ailesiyle ilgili çalışma sonuçları da çelişkilidir. Chien ve ark.'nın (103) plazmada miRNA-29a, miRNA-29b ve miRNA-29c'de düzeylerini, tip 2 diyabetik hastalarda araştırdığı çalışmada miRNA-29a ekspresyon düzeyi diyabetik nefropatili hastalarda NAlb gruba göre daha yüksek bulmuştur. miRNA-29b ve miRNA-29c ise gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. Kong ve ark.'nın (120) yaptığı çalışmada ise tip 2 diyabetik hastaların serumunda bakılan miRNA-29a düzeyinin normal glukoz toleransı olanlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Anna Zampetaki ve ark.'nın (102) tip 2 diyabetik hastaların plazmasında baktığı miRNA-29b kontrol grubuna göre düşük saptanmıştır. Sonuçlardaki farklılık miRNA-29 ailesinin diyabetik nefropati süresince farklı dokularda farklı mekanizmalarla farklı seviyede eksprese edilmesinden kaynaklı olabilir. Klinik çalışmalarda aynı evrede hasta bulunması zorlayıcı olduğundan diğer mikroRNA'larda gözlemlendiği gibi doku kültürü ve deneysel çalışmalar evrelerdeki değerlendirmeler açısından daha yararlı görünmektedir.

miRNA-29 ailesinin (miRNA-29a, miRNA-29b, miRNA-29c) ekspresyonundaki artışın pankreatik beta hücrelerinin kaybından, dolayısıyla Tip 1 diyabetin birinci evresinden sorumlu anahtar faktör olduğu bilinmektedir (121).

Profibrotik olaylarda rol oynayan çok sayıda protein miRNA-29'un hedefleri arasındadır. Bu bağlamda, fibrotik olaylardan sonra akciğer, kalp ve böbrek gibi organlarda endojen miRNA-29'da azalma görülmesi normal sayılmaktadır. TGF- $\beta$ 1, SMAD3'e bağlı mekanizmayla miRNA-29b ekspresyonunu azaltarak fibrozisi

hızlandırır. Kronik böbrek ve akciğer hastalıklarında miRNA-29b'nin fibrosizle karşı terapötik kullanım potansiyeli vardır (122). Anti-miRNA-29 oligomerlerle miRNA-29'un baskılanması diyabetik nefropatiye karşı koruyucudur ve çeşitli çalışma sonuçları miRNA-29'un diyabetik belirteç olduğunu desteklemektedir. Diyabetik rodent ve insanlarda yapılan modellerde üyelerden bazılarının farklı dokularda arttığı saptanmıştır. Böbrekte miRNA-29c arttığı belirtilmektedir (123). Kanasaki ve ark. (124) diyabetik farelerdeki fibrozisin baskılanmasında rol oynayan dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörü Linagliptin ile böbrekte miRNA-29b ekspresyonunu artırmışlardır. Hiperglisemik ortamda miRNA-29 azalmaktadır. Antidiyabetik Linagliptin miRNA-29 ekspresyonunu artırır (124).

miRNA-29 akciğer (125), karaciğer (126), kalp (127,128) deri (129) ve böbreğin (130,131) fibrozisle giden pek çok hastalığında ve kanserlerde (132,133) aktif rol oynar. miRNA-29'ların diyabet ve mikrovasküler komplikasyonlarından biri olan nefropatiyle ilişkilerini araştırmak için hücre kültüründe (134-136) ve fare böbrek dokularında (130,137,138) yapılan deneysel çalışmalar ile plazmada (102,103), serumda (120) ve idrarda (12,15,65,101,139) gerçekleştirilen birçok çalışmanın bulguları miRNA-29'ların antifibrotik etkili olduğunu göstermektedir. Chen ve ark. (137) diyabetik sıçanlarda DN açısından miRNA-29b'nin terapötik potansiyelini incelemişler ve genetik terapiyle miRNA-29b'nin db/db sıçanlarda renal hasarı engellediğini göstermişlerdir. Gondaliya ve ark. (140) renal proksimal tübül hücrelerin in vitro diyabetik modelinde miRNA-29b'nin aşırı metilasyonu düzenlediğini ve bu şekilde DNA metilasyonuna bağlı DN'yi engellediğini göstermişlerdir.

miRNA-29 üyelerinin hedef genlerinin örtüşmesine (131) karşın çalışmalar ya aile olarak değerlendirmekte ya da terapötik etkileri açısından belirli üyeye odaklanılmaktadır. Bu bilgileri de temel alarak diyabetik nefropatide üç miRNA-29'u da değerlendirdik.

Kandaki analizlere göre daha değişken olan idrar analizlerinde yapılan çalışmalar farklı sonuçlar içermektedir. Aşırı proteinürisi olan tip 1 diyabetik nefropatili hastaların idrarında miRNA-29b yüksek (139), diyabetik nefropatili hastaların idrarda miRNA-29a düzeyi yüksek (141), tip 2 diyabetik nefropatili



hastalarda miRNA29a/b/c düşük (101) iken tip 2 diyabetik nefropatili hastaların idrarında miRNA29a/b/c kontrol ile anlamlı fark çıkmamıştır (15).

miRNA-29 ailesi diyabet ile yakından ilişkili görüldüğü için özellikle terapötik amaçlı çalışmalar yaygındır. Dolaşımdaki çalışmalar henüz klinik yararlanım açısından çok sayıda çalışmanın yapılmasına ihtiyaç olduğu yönündedir.

Çalışmamızda plazmalarında *miRNA-126* saptanabilen birey oranları (saptanan/çalışılan) kontrol grubunda 50/50; NAlb'de 51/51; MikAlb'de 25/25; MakAlb'de 24/24 idi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda kontrollere göre diyabetiklerde 1 kat artma ( $p=0,862$ ); NAlb'de yaklaşık 1 kat artma ( $p=0,300$ ) ve DN grubunda 1,5 kat azalma ( $p=0,226$ ); MikAlb'de 1 kat azalma ( $p=0,555$ ); MakAlb'de 1,5 kat azalma ( $p=0,164$ ) gözlemlendi. miRNA-126 sistatin C'ye ( $r=0,417$ ,  $p=0,034$ ) göre eGFR ile anlamlı, pozitif korelasyon gösterdi.

Yang ve ark.'nın (142) tip 2 DM grubunda (kontrol  $n=53$ , DM  $n=230$ , NAlb  $n=92$ , MikAlb  $n=87$ , MakAlb  $n=51$ ) miRNA-126 ekspresyon düzeylerini araştırdıkları çalışmada serum miRNA-126 ekspresyon düzeylerini MakAlb, MikAlb ve NAlb grupta kontrol grubuna göre daha yüksek bulmuşlardır. Biz çalışmamızda miRNA-126'yı NAlb grubu haricinde diğer albuminürik gruplarda düşük bulduk.

Al-Kafaji ve ark. (7) diyabetik hastalarda yaptıkları çalışmada [kontrol  $n=50$ , NAlb  $n=52$ , DN  $n=50$  (MikAlb  $n=29$ , MakAlb  $n=21$ )] tam kanda miRNA-126 ekspresyon düzeylerini tip 2 diyabetiklerde ve DN grupta kontrol grubuna göre azalmış olarak saptamışlardır. Bu sonuç bizim çalışmamızda DN grubundaki bulgularla uyumludur. miRNA-126 düzeyleri albuminüri ile pozitif, eGFR düzeyleri ile negatif, anlamlı korelasyon göstermiştir. NAlb grubunu DN gruptan (AUC=0,854), kontrol grubunu DN'den ayırmada (AUC=0,959) miRNA-126'nin tanısal performansı yüksek bulunmuştur. Biz çalışmamızda miRNA-126 düzeyini gruplar arası istatistiksel olarak farklı bulmayıp miRNA-126 düzeyinin albuminüri ile negatif yönde ve CKD-EPI-sisC ile pozitif yönde, anlamlı korelasyon gösterdiğini saptadık.

miRNA-126'nın tip 2 DM ile yakından ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (102). Liu ve ark.'nın (143) çalışmaları da prediyabet ve tip 2 DM'li hastaların 6 aylık sıkı kontrollü tedaviden sonra serum miRNA-126 düzeylerinin yükseldiğini göstermektedir.

Bu farklı bulgular klinik çalışmalarda dolaşımdaki mikroRNA'ların çok dikkatli yorumlanmasını göstermektedir. Hastaların tedavi durumları gözönüne alınmalıdır. miRNA-126 bu bağlamda tedavinin izlenmesi açısından yararlı olabilir.

MikroRNA'lara yaklaşım deneysel çalışmalar, doku kültürü ve biyopsilerle değerlendirilerek ilaç açısından biyobelirteç bulunması yönünde çalışmalara daha çok odaklanılmaktadır. Fish ve ark.'nın (87) yaptığı çalışmada fare embriyonik kök hücrelerinden türetilmiş endotelial hücrelerde RT-PCR yöntemi ile miRNA-126'nın endotelial hücrelerin VEGF'ye yanıtını (proliferasyon, migrasyon, kapiller ağ oluşumu) düzenlediği bulunmuştur. miRNA-126, Sprouty-ilişkili protein (SPRED1) ve fosfoinozitol-3 kinaz düzenleyici alt-birimi 2 (PIK3R2) gibi VEGF yolunun negatif düzenleyicilerini doğrudan baskılar. Bu bulgu miRNA-126'nın diyabetin mikrovasküler komplikasyonu olan diyabetik nefropatide damar bütünlüğü ve anjiyogenezin düzenlenmesinde yer alabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır.

Çalışmamızda plazmalarında *miRNA-129-3p* saptanabilen birey oranları (saptanan/çalışılan) kontrol grubunda 12/50; NAlb'de 5/51; MikAlb'de 4/25; MakAlb'de 5/24 idi. miRNA-129-3p istatistiksel olarak yeterli sayıda olmadığı için değerlendirilmedi.

Çalışmamızda plazmalarında *miRNA-137* saptanabilen birey oranları (saptanan/çalışılan) kontrol grubunda 8/50; NAlb'de 8/51; MikAlb'de 6/25; MakAlb'de 2/24 idi. miRNA-129-3p istatistiksel olarak yeterli sayıda olmadığı için değerlendirilmedi.

Çalışmamızda plazmalarında *miRNA-192* saptanabilen birey oranları (saptanan/çalışılan) kontrol grubunda 50/50; NAlb'de 51/51; MikAlb'de 25/25; MakAlb'de 24/24 idi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda kontrollere göre diyabetiklerle 2 kat azalma ( $p=0,029$ ); NAlb'de 1,5 kat azalma ( $p=0,463$ ) ve DN grubunda 2,4 kat azalma ( $p=0,027$ ); MikAlb'de 3 kat azalma; MakAlb'de 2,3 kat azalma gözlemlendi. miRNA-192; CKD-EPI-Kreat ( $r=0,185$ ,  $p=0,023$ ), ve sistatin C'ye göre hesaplanmış eGFR ( $r=0,203$ ,  $p=0,013$ ) pozitif, anlamlı korelasyon gösterdi. miRNA-192 mikroalbumiüri ile negatif, anlamlı korelasyon gösterdi ( $r=-0,267$ ,  $p=0,001$ ).

Çalışmamız kapsamındaki miRNA-192, böbrekte eksprese edilen mikroRNA'lar arasında anahtar mikroRNA'lardandır (144,145). miRNA-192, diyabetik nefropatinin de yer aldığı pekçok böbrek bozukluğunda düzenleyici faktör olarak rol oynar (66,146,147).

Tüm mikroRNA'lardaki gibi miRNA-192'nin de çok sayıda dokuda eksprese edilmesi, aynı organda farklı bölgelerdeki etkileri de dahil çok çeşitli dokularda etkilerinin bulunması nedeniyle miRNA-192 ile ilgili diyabetik nefropatinin asıl nedeni olan fibroziste rol oynayan sitokinlerin etki mekanizmalarına odaklı çalışmalar çoğunluktadır. Terapötik amaçlı biyobelirteç bulmaya hedefli çalışmalar doku, hücre ve deneysel çalışmalarla sürdürülmektedir (5,66,148).

Diyabetik nefropatinin özellikle ileri evresinde glomerüloskleroz ve tübülointertisyel fibrozisten başlıca sorumlu sitokin TGF- $\beta$ 'nin etki mekanizmasına odaklanan çalışmalarda, miRNA-192 düzeyinin SDBH olanlarda progresif ve nonprogresif nefropatililere göre düşük olduğu ve bu düşüklüğün histopatolojik olarak böbrek dokusunda bakılan tübülointertisyel fibrozisle uyumlu olduğu saptanmıştır. Proksimal tübüler epitel hücrelerde, artan TGF- $\beta$ 'in miRNA-192 ekspresyonunu azaltarak E-Box represör proteinlerinden olan ZEB1 ( $\delta$ EF1) ve ZEB2 (SIP1) aracılığıyla epitelyal cadherin (E-cadherin) ekspresyonunu baskıladığı bulunmuştur (14,40,149). miRNA-192 ekspresyon azalışının tübülointertisyel fibrozisle olan ilişkisi diyabetik nefropatili farelerin böbreklerinde ve insan renal tübüler epitel hücrelerinde incelenmiştir. Azalan miRNA-192, mezengiyal hücre proliferasyonunu ve TGF- $\beta$  ekspresyonunu artıran early growth response factor 1 (Egr1)'i artırmaktadır (56).

miRNA-192'nin ekspresyon artışı fare çalışmalarında daha çok glomerüller ve mezengiyal hücrelerde iken, azalışı insan hücre çalışmalarında daha çok tübüler epitel hücrelerde iken (13,14,150). Ayrıca insan hücre çalışmalarında miRNA-192 ZEB1 ve ZEB2'yi hedeflerken farelerde sadece ZEB2'yi hedefler (146). Bu bilgiler miRNA-192'nin renal korteks ve medullada ekspresyon paternlerinin ve moleküler hedeflerin doku tipine göre ve hatta hücre tipine göre sonuçları değiştirebileceğini düşündürmektedir. Deneysel ortamda oluşturulan nefropatiye göre insanda doğal

süreçle oluşan nefropatinin farklılıkları ve deneysel ortamda muamele edilen TGF- $\beta$  dozları da bu farklılıklara yol açmış olabilir (13,14).

Tüm bu bilgiler ışığında miRNA-192'den klinik yararlanımı durumunun değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda plazma miRNA-192-5p göreceli ekspresyon değerlerinin diyabetik nefropatili hastalarda kontrol grubundan anlamlı derecede (2,4 kat) azalmış olduğunu saptadık. Bu bulgumuz dolaşımdaki miRNA-192 ekspresyonunun diyabetik nefropatide azaldığını saptayan çalışmalarla uyumlu idi (142,151).

miRNA-192'nin nefropatiyle olan ilişkisi daha çok doku ve hücre çalışmalarıyla aydınlatılmaya çalışılmıştır ancak; miRNA-192'nin klinik kullanımı için serum, plazma veya idrar örneklerinin birarada değerlendirildiğinde araştırmaya ihtiyaç vardır (146). Diyabetik nefropatili hastalarla kontrol grubu arasında yapılan bir çalışmada miRNA-192 düzeyi serumda düşük idrarda yüksek bulunmuştur. Diyabetik hastalar 24 saatlik idrarda albumin atılımına göre gruplara ayrıldığında serum miRNA-192 düzeyi MakAlb grupta MikAlb ve NAlb gruba göre daha düşük bulunmuştur. miRNA-192'nin DN grubu NAlb gruptan ayırmada tanısal performansı yüksektir (AUC=0,780)(142). Diyabetik nefropatili hastaların idrarında miRNA-192'i ekspresyonunun araştırıldığı başka bir çalışmada da benzer olarak miRNA-192 yüksek çıkmıştır. Ancak MikAlb grup NAlb gruptan yüksek iken MakAlb ile NAlb grup arasında farklılık gözlenmemiştir (141). Bu çalışmalardaki idrar analizinde bakılan hücrelerin kaynağı renal hasar sonucu idrara çıkan podositler olabileceği gibi tübüler epitel hücreleri de olabilir. Ayrıca dolaşımda bulunan miRNA-192'nin düzeyi, atılımı ya da yıkılımı da idrar miRNA-192 düzeylerini etkilemiş olabilir. Ancak bu konuda henüz yeterli çalışmalar mevcut olmayıp yapılacak çalışmalar hem plazma hem idrar hem de dokuda hücresel kaynaklarını daha net belirlemeli ve farklı örneklerdeki miRNA-192 düzeyleri birarada değerlendirilmelidir.

Çalışmamızda bakılan miRNA-192'nin diyabetik nefropatili hastalarda düşük çıkması yukarıda bahsedilen çalışmaların çoğuyla uyumlu olup miRNA-192-5p'nin diyabetik nefropatiyi kontrol grubundan ayırmadaki tanısal performansı yüksektir ancak; eGFR hesaplamalarına kıyasla ek tanısal ve prognostik bilgi sağlayamamıştır

(Bkz. Şekil 12 ve 13). miRNA-192'nin plazma ve idrarda birlikte bakılıp değerlendirilmesi DN tanı ve prognozu için daha faydalı olacaktır.

Çalışmamızda plazmalarında *miRNA-212* saptanabilen birey oranları (saptanan/çalışılan) kontrol grubunda 26/50; NAlb'de 20/51; MikAlb'de 11/25; MakAlb'de 14/24 idi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda kontrollere göre diyabetiklerle 2 kata yakın azalma ( $p=0,182$ ); NAlb'de 1 kat artma ( $p=0,351$ ) ve DN grubunda 3 kat azalma ( $p=0,057$ ); MikAlb'de 5 kat azalma ( $p=0,139$ ); MakAlb'de 2 kat azalma ( $p=0,109$ ) gözlemlendi. miR-212 GFR ile anlamlı korelasyon göstermedi.

miRNA-212 ile ilgili çalışmalar, hepatik patofizyoloji, glukoz metabolizması, kardiyak hipertansiyon, kalp yetmezlikleri, diyabetik nefropati ve nöronal alanlar gibi çok sayıda alanda yürütülmektedir (152-155) .

Shang ve ark. (156) pankreas hücrelerinde yaptıkları çalışmada pankreas- $\beta$  hücrelerine glukoz ve glukagon benzeri peptit 1 (GLR-1) maruziyetinden sonra GLP-1'in pankreas- $\beta$  hücrelerinde cAMP/protein kinaz A sinyal yoluyla miRNA-212 ekspresyonunu arttırdığını ve bu artışın glukoz ve GLP-1 uyarımlı insülin sekresyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Soni ve ark. (157) da fare pankreas hücrelerinde miRNA-212 aşırı ekspresyonunun, glukoz ve diğer sekretagoglara yanıt olarak insülin sekresyonunu arttırdığını göstermiştir.

miRNA-212 böbrek ve diğer dokulardaki renin-anjiyotensin tarafından düzenlenen ve böbrek hastalıkları, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili mikroRNA'lar arasında yer almaktadır (158). Antihipertansif olarak ARB kullanan insan arterlerinde miRNA-212 ekspresyonu azalırken ACE inhibitörleri kullananlarda etkilenmediği saptanmıştır.

miRNA-212 ile ilgili diyabetik hastalarda plazmada yürütülmüş çalışmaya rastlamadık. Beltrami C. ve ark'nın (154) diyabetik nefropatili hastaların idrar mikroRNA'larını araştırdığı çalışmada DN hastalarında miRNA-212 ekspresyonunun artış gösterdiği saptanmıştır.

Hastalıkla veya bozuklukla ilişkili miRNA'ların değerlendirilmesi çalışmaları her miRNA'nın kaynaklandığı doku ve dokulardaki spesifik hücreler, etkiledikleri

hücre, doku, organ ve metabolik yollar netleştikçe daha yararlı olabilecektir. Dolaşımdaki miRNA'ların kaynakları oldukça kompleks olduğundan çalışmalar daha spesifikleştikçe yararları hakkında bilgi elde edilebilecektir. Bu akış açısıyla değerlendirildiğinde miRNA-212'nin NAlb grupta çok az yükselmiş olması, MikAlb grupda oldukça düşük gözlenmesi bu miRNA'dan klinik yararlanım için daha ileri araştırmalara ihtiyaç olduğunu söylenebilir.

Çalışmamızda plazmalarında *miRNA-320c* saptanabilen birey oranları (saptanan/çalışılan) kontrol grubunda 50/50; NAlb'de 51/51; MikAlb'de 25/25; MakAlb'de 24/24 idi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda kontrollere göre diyabetiklerle 2 kat azalma ( $p=0,080$ ); NAlb'de 2 kat azalma ( $p=0,220$ ) ve DN grubunda 2 kata yakın azalma ( $p=0,071$ ); MikAlb'de 2 kata yakın azalma ( $p=0,281$ ); MakAlb'de 1,5 kat azalma gözlemlendi. *miRNA-320c* mikroalbumiüri ile negatif, anlamlı korelasyon gösterdi ( $r=-0,172$ ,  $p=0,032$ ).

Diyabet ile ilişkili miRNA'lar arasında bulunan *miRNA-320* çoğunlukla diyabetin kardiyovasküler komplikasyonlarıyla ilişkilendirilmektedir. *miRNA-320* iskelet kasında ve yağ dokusunda insülin duyarlılığının düzenlenmesinde ve endotel disfonksiyonunda rol oynar (88,152). Feng ve ark.'nın (159) streptozosin muamale edilmiş diyabetik farelerin renal kortikal dokularında analiz ettikleri *miRNA-320*'nin ekspresyonunda azalma bulmuşlardır.

Wang ve ark.'nın (160) miyokard mikrovasküler endotel hücrelerinde gerçekleştirdikleri çalışmasında *miRNA-320*'nin diyabette bozulmuş anjiyogenezde rol alabileceği sonucunu elde etmişlerdir. Delic ve ark. (15) tip 2 diyabetik hastaların idrar eksozomlarında *miRNA-320*'nin güçlü bir şekilde eksprese olduğunu saptamışlardır. *miRNA-320*'nin renal fibrozis ile ilişkili metabolik yollarda etkili olabileceğini işaret eden sonuçlar bulunmaktadır. DN grupta *miRNA-320c* ekspresyon düzeyi diyabetik grup ve kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. *miRNA-320c* ekspresyon düzeyi eGFR ile negatif korelasyon göstermiştir. Liu ve ark.(161) *miRNA-320*'yi yeni tanı konmuş tip 1 diyabetik hastada beta-hücre hasarıyla ilişkili biyobelirteç olarak saptamışlardır. Bijkerk ve ark.'nın (162) yaptığı çalışmada ise tip1 DN hastalarında kontrole göre plazma *miRNA 320c* düzeyi yüksek saptanmıştır.

miRNA'ların plazma (99,102,162) ve serumda (103,120,142) ölçüldüğü çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Çoğunlukla mikroveziküllerde/ekzosomlarda ölçümler yapılmaktadır ve miRNA'ların ekzosomlarda daha bilgi verici olacağı görüşü yaygındır. Ancak ekstrasellüler miRNA'ların %90'nından fazlası Ago 2 proteiniyle kompleks halinde bulunmaktadır (163). Bu bağlamda dolaşımdaki ekzosomal olmayan miRNA'ların analizi önem kazanmaktadır. Ancak preanalitik evrenin henüz standardize edilmemiş olması (163,164) analiz sonuçlarında değişkenliklere neden olabilir. Preanalitik evreye kit üreticisinin tüm talimatlarına uyulmasına karşın çalışmalar arasında farklı bulguların elde edilmesi henüz standardize edilememiş preanalitik evreden kaynaklanabilir.

Ekstrasellüler miRNA'lardaki değişkenliklerin çok sayıda nedeni olabilir (80). Kaynaklandığı doku veya dokular, kaynaklanma nedeni, dolaşıma salınma evresi, bozukluk veya hastalığın evresi, preanalitik, analitik evreler (analiz yöntemleri) ve yorumlanması, vb. çok sayıda etken vardır. Bu bağlamda diagnostik biyobelirteç açısından henüz emekleme evresindedir.

Bu sonuçlar, bu miRNA'ların diyabetik nefropati ile olan ilişkisini açıklayacak birden fazla mekanizmaların varlığı ile açıklanabilir. Bu yüzden daha fazla örneklem ile daha kapsamlı kohort çalışmalarına ihtiyaç vardır. Yapılan çalışmalar dolaşan miRNA'ların tespitinde plazma, serum ya da tam kanın birbirine üstünlüğünü kanıtlanamamıştır. Çalışma sonuçlarındaki farklılıklar çalışılan örnek türü ve olası interferanlar gözönünde bulundurularak karşılaştırılmalıdır (165,166). Yapılacak ileri araştırmalarda diyabetik hastaların böbrek biyopsilerinde ve idrar örneklerinde de bu miRNA'ları araştırmak özellikle kanda tespit edilmesi güç miRNA'ların işlevi konusunda daha net bilgi sağlayabilir. Ayrıca hastaların belirli periyotlarla (3-6 aylık) biyokimyasal ölçümlerinin takibe alınması ve nefropatinin progresyonu açısından miRNA düzeylerine tekrar bakılması bu miRNA'ların diyabetik nefropatiyle olan ilişkisini daha kapsamlı açıklayabilir. Ancak unutulmamalıdır ki birden fazla miRNA bir hastalığın patogenezinde yer aldığı gibi bir miRNA da birden fazla hastalığın patogenezinde rol alabilir (81). Bu açıdan bakıldığında belirli hastalıklarda etkisi netleşmiş olan miRNA'lara birarada bakılıp değerlendirmek o hastalıkla ilgili daha doğru fikir verecektir. Ayrıca hastalarda kullanılan ilaçlar ve

mevcut komorbid durumlar mutlaka göz önünde bulundurularak hastaların değerlendirilmesi daha doğru olacaktır.

Günümüzde ilaç tedavisi tip 2 diyabetin ilerlemesini yavaşlatmanın en güçlü yolu olmaya devam etmektedir. Anti-diyabetik ilaçlar, insülin direncini azaltmak için adipoz ve kas dokusunu hedefleyebilir, glukoz üretimini inhibe etmek için karaciğer üzerinde etkili olabilir veya insülinin salınması için pankreası stimüle edebilir. Bu ilaçlar diyabetin etkilerini azaltmaya yardımcı olur, ancak hastalığın ilerlemesini tamamen durduramaz. Bu yüzden yeni diyabet ilaçlarına ihtiyaç vardır. Gelecekte diyabet tedavisinde çoklu genleri hedefleyen miRNA'lar farmakolojik hedefler haline getirilerek insülin direncini azaltmak ve pankreatik beta hücre fonksiyonunu düzeltmek için kullanılabilir (145).



## SONUÇLAR

- miRNA-21-3p çalışma gruplarında bireylerin yaklaşık yarısında saptandı. Plazmadan ekstraksiyon yöntemi değerlendirilmelidir. miRNA-21-3p gruplar arasındaki karşılaştırmalarda kontrollere göre; tüm alt gruplarda azalma gösterdi. NAlb ve MikAlb hariç hepsinde 5-7 kat arasındaki azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kreatinin klirensi ve serum kreatinine göre hesaplanmış GFR haricinde MDRD ve sistatin C'ye göre hesaplanmış GFR'ler ile pozitif yönde; mikroalbuminüri ve HbA1c ile negatif yönde anlamlı korelasyon gösterdi. miRNA-21-3p'nin diyabetik nefropatiyi sağlıklı kişilerden ayırmadaki tanısal performansı yüksekti Bulgularımız, miRNA-21'in diyabetik nefropatiyle ilişkili miRNA'lardan olduğunu desteklemektedir.
- miRNA-29a-3p çalışma gruplarında tüm bireylerde saptanmıştır. Tüm gruplarda, 1,5-2 kat arasında, istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan azalmalar saptandı. miRNA-29a-3p eGFR değerleriyle anlamlı korelasyon göstermedi. miRNA-29a'nın DN ile ilişkisi desteklenmemektedir.
- miRNA-29b-3p çalışma gruplarında tüm bireylerde saptandı. Alt gruplardan yalnız DN ve mikroalbuminürik gruplarda kontrole göre 1 kat azalma saptandı. Diğer gruplarda hepsi 1 kat olan artışlar da dahil tüm farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. eGFR değerleriyle de anlamlı korelasyon göstermedi. miRNA-29b'nin DN tanısında yararlığı ile ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır
- miRNA-29c-3p çalışma gruplarında tüm bireylerde saptandı. Tüm altgruplarda kontrole göre azalma saptandı. MDRD eGFR ile pozitif; mikroalbuminüri ile negatif yönde anlamlı ilişki gösterdi. Azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da miRNA-29c DN tanısı açısından yararlı olabilir, ancak daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır.
- miRNA-126-3p çalışma gruplarında tüm bireylerde saptandı. Kontrollere göre tüm diyabetik grup ve NAlb'de artma gözlenirken, DN, MikAb ve MakAlb gruplarında azalma gözlemlendi. Farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı

bulunmadı. Sistatin C'ye göre hesaplanmış GFR ile pozitif yönde anlamlı korelasyon gösterdi. DN açısından daha çok araştırma gerekmektedir.

- miRNA-129-1-3p ve miRNA-137'nin DN ile ilişkisi saptanamadı.
- miRNA-192-5p çalışma gruplarında tüm bireylerde saptandı. Kontrollere göre NAlb'deki istatistiksel anlamlı bulunmayan azalma haricinde tüm gruplarda gözlenen azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Serum kreatinin ve sistatin C'ye göre hesaplanmış GFR değerleri pozitif yönde; mikroalbuminüri ile negatif yönde anlamlı korelasyon gösterdi. Diyabetik nefropatiyi sağlıklı kişilerden ayırmadaki tanısal performansı yüksek bulundu. Bulgularımız, miRNA-192'nin diyabetik nefropatiyle ilişkili miRNA'lardan olduğunu desteklemektedir.
- miRNA-212-3p çalışma grubundaki tüm bireylerin yaklaşık yarısında saptandı. MikAlb'de 5 kat olmak üzere tüm gruplarda kontrollere göre azalma gözlemlendi. Azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. eGFR ile anlamlı korelasyon göstermedi. miRNA-212'nin DN ile ilişkisi için daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır.
- miRNA-320 çalışma grubunda tüm bireylerde saptandı. Tüm gruplarda kontrollere göre azalma saptandı. Bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Mikroalbuminüri ile negatif yönde anlamlı korelasyon gösterdi. miRNA-320'nin DN ile ilişkisi açısından daha çok araştırma gereklidir.
- Hastalardaki renal hasar evrelerinin mikroRNA'ları etkiledikleri dikkate alınmalıdır.
- Hastaların kullandıkları ilaçlara göre gruplandırılmaları önem arz etmektedir.

## KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Global report on Diabetes. Isbn. 2016;978:88.
2. Dorsey JL, Becker MH, Al. E. Glycemic targets: Standards of medical care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(1):55-64.
3. Lim AKH. Diabetic nephropathy -Complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2014;7:361-381.
4. Diabetes a major risk factor for kidney disease. National Kidney Found. 2015. <https://www.kidney.org/atoz/content/diabetes>.
5. Sharma D, Bhattacharya P, Kalia K, Tiwari V. Diabetic nephropathy: New insights into established therapeutic paradigms and novel molecular targets. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017;128:91-108.
6. Currie G. Biomarkers in diabetic nephropathy: Present and future. *World J Diabetes*. 2014;5(6):763.
7. Al-Kafaji G, Al-Mahroos G, Al-Muhtaresh HA, Skrypnyk C, Sabry MA, Ramadan AR. Decreased expression of circulating microRNA-126 in patients with type 2 diabetic nephropathy: A potential blood-based biomarker. *Exp Ther Med*. 2016;12(2):815-822.
8. Simpson K, Wonnacott A, Fraser DJ, Bowen T. MicroRNAs in diabetic nephropathy: From Biomarkers to Therapy. *Curr Diab Rep*. 2016;16(3):1-7.
9. Chiu RWK, Dennis Lo YM. Principles of molecular biology. *Tietz Textb Clin Chem Mol Diagnostics*. 2012:1209-1223.
10. Kato M, Putta S, Wang M, et al. TGF- $\beta$  activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nat Cell Biol*. 2009;11(7):881-889.
11. McClelland AD, Herman-Edelstein M, Komers R, et al. miR-21 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting PTEN and SMAD7. *Clin Sci*. 2015;129(12):1237-1249.
12. Wang G, Kwan BCH, Lai FMM, Chow KM, Li PKT, Szeto CC. Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: Novel biomarkers of fibrosis. *Am J Nephrol*. 2012;36(5):412-418.
13. Kato M, Zhang J, Wang M, et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(9):3432-3437.
14. Krupa A, Jenkins R, Luo DD, Lewis A, Phillips A, Fraser D. Loss of microRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(3):438-447.
15. Delic D, Eisele C, Schmid R, et al. Urinary exosomal miRNA signature in type II diabetic nephropathy patients. *PLoS One* 2016; 11:
16. Eskildsen T V., Jeppesen PL, Schneider M, et al. Angiotensin II regulates microRNA-132/-212 in hypertensive rats and humans. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):11190-11207.
17. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes

- Mellitus. *Diabetes Care*.2014; 37: 81-90.
18. Kerner W, Brückel J, German Diabetes Association . Classification and diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122(7):384-386.
  19. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 8th Ed. Brussels, Belgium, International Diabetes Federation, 2017.; 2017.
  20. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, et al. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol*. 2013;28(2):169-180.
  21. Türk Diyabet Vakfı. *TURKDİAB Diyabet tanı ve tedavi rehberi 2017*. 2017: 14-18.
  22. Baynest HW. Classification, pathophysiology, diagnosis and management of Diabetes Mellitus. *J Diabetes Metab*. 2015;06(05):1-9.
  23. Türk Diyabet Vakfı, İnsülin Direnci Çalıştay.İnsülin direnci çalıştayı sonuç raporu 2017.2017: 10-15.
  24. Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. *Endocr Rev*. 2016;37(3):278-316.
  25. American Diabetes Association. Standarts of medical care in Diabetes-2014. *Diabetes Care*; 37: 14-80.
  26. Schneider H, Shaw J, Zimmet P. Guidelines for the detection of diabetes mellitus-diagnostic criteria and rationale for screening. *Clin Biochem Rev*. 2003;24:77-80.
  27. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2011;34:61-99.
  28. World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia : report of a WHO/IDF consultation. *WHO Doc Prod Serv Geneva, Switz*. 2006:50.
  29. States U, Health N, Survey NE, et al. *Diabetes Mellitus*. Tietz Textb Clin Chem Mol Diagnostics,. 2012;6th Ed.:1415-1456.
  30. American Diabetes Association. Tests of glycemia in Diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(1):106-108.
  31. Gürdöl F. *Tıbbi biyokimya*. Nobel Kitabevleri.2015:
  32. Little RR, Rohlfing CL. The long and winding road to optimal HbA1c measurement. *Clin Chim Acta*. 2013;418:63-71.
  33. Florkowski C. HbA1c as a diagnostic test for diabetes mellitus - Reviewing the evidence. *Clin Biochem Rev*. 2013;34(2):75-83.
  34. Pathways N, Pathways N, Pathway N. *Managing blood glucose in adults with type 2 diabetes*. 2018.
  35. Welsh KJ, Kirkman MS, Sacks DB. Role of glycated proteins in the diagnosis and management of diabetes: Research gaps and future directions. *Diabetes*

- Care. 2016;39(8):1299-1306.
36. Clinical Practice Guidelines Committees. Diabetes Canada 2018 clinical practice guidelines for the prevention and management of Diabetes in Canada. *Can J Diabetes*. 2018;42(Supplement 1):1-342.
  37. Herman-Edelstein M, Scherzer P, Tobar A, Levi M, Gafter U. Altered renal lipid metabolism and renal lipid accumulation in human diabetic nephropathy. *J Lipid Res*. 2014;55(3):561-572.
  38. User A, Academic U, Universitesi P. KDOQI Clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for Diabetes and chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2007;49(2):13-19.
  39. Gross JL, De Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani H, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: Diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care*. 2005;28:176-188.
  40. Umanath K, Lewis JB. Update on diabetic nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis*. 2018;71(6):884-895.
  41. Kurt M, Atmaca A, Gürlek A. Diyabetik nefropati. *Hacettepe Tıp Derg*. 2004;19(2):113-121.
  42. Delaney MP, Price CP, Lamb EJ. Kidney Disease. *Tietz Textb Clin Chem Mol Diagnostics*. 2012:1523-1607.
  43. Schwandt A, Denking M, Fasching P, et al. Comparison of MDRD, CKD-EPI, and Cockcroft-Gault equation in relation to measured glomerular filtration rate among a large cohort with diabetes. *J Diabetes Complications*. 2017;31(9):1376-1383.
  44. Michael P. Delaney B.Sc., M.D., F.R.C.P., Christopher P. Price Ph.D., F.R.S.C. FRCP and EJ, Lamb Ph.D. FRCP. Kidney disease. *Tietz Textb Clin Chem Mol Diagnostics 6th Ed*. 2012:1523-1607.
  45. Simetić L, Zibar L, Drmić S, et al. Creatinine clearance and estimated glomerular filtration rate – When are they Interchangeable. *Coll Antropol*. 2015;39(3):735-743.
  46. MacIsaac RJ, Tsalamandris C, Thomas MC, et al. Estimating glomerular filtration rate in diabetes: A comparison of cystatin-C- and creatinine-based methods. *Diabetologia*. 2006;49(7):1686-1689.
  47. Mussap M, Vestra MD, Fioretto P, et al. Cystatin C is a more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients. *Kidney Int*. 2002;61(4):1453-1461.
  48. Tonnejck L, Muskiet MHA, Smits MM, et al. Glomerular hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, clinical significance, and treatment. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(4):1023-1039.
  49. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(11):1832-1843.
  50. Papadopoulou-Marketou N, Kanaka-Gantenbein C, Marketos N, Chrousos GP, Papassotiriou I. Biomarkers of diabetic nephropathy: A 2017 update. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017;54(5):326-342.

51. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: A meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2002;40(2):221-226.
52. Kar S, Paglialunga S, Islam R. Cystatin C is a more reliable biomarker for determining eGFR to support drug development studies. *J Clin Pharmacol.* 2018;(March).
53. Fadem S, Rosenthal B. GFR calculators. Erişim tarihi 28.02.2018. <http://mdrd.com/>.
54. Group KDIGO. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Int Soc Nephrol.* 2013;3(1):1-136.
55. Goyal R, Jialal I. *Diabetes Mellitus, type 2.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018: 1-12.
56. Liu F, Zhang Z, Xin G, Guo L, Jiang Q, Wang Z. miR-192 prevents renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy by targeting Egr1. 2018:4252-4260.
57. Atasoy A, Atay A, Ahabab S, Hanedar M, Yenigün M. Diyabetik nefropati'ye genel bir bakış. *Haseki Tip Bul.* 2015;53(1):16-19.
58. Magee C, Grieve DJ, Watson CJ, Brazil DP. Diabetic nephropathy: a tangled web to unweave. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2017;31(5-6):579-592.
59. Leung WK, Gao L, Siu PM, Lai CW. Diabetic nephropathy and endothelial dysfunction: Current and future therapies, and emerging of vascular imaging for preclinical renal-kinetic study. *Life Sci.* 2016;166:121-130.
60. Beckman JA, Creager MA. Vascular complications of diabetes. *Circ Res.* 2016;118(11):1771-1785.
61. Roshan B, Stanton RC. A story of microalbuminuria and diabetic nephropathy. *J Nephropathol.* 2013;2(4):234-240.
62. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(1):4-4.
63. Delanaye P, Glassock RJ, Pottel H, Rule AD. An Age-calibrated definition of chronic kidney disease: Rationale and benefits. *Clin Biochem Rev.* 2016;37(1):17-26.
64. Feng J, Xing W, Xie L. Regulatory roles of microRNAs in diabetes. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10):1-12.
65. Fiseha T. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Biomark Res.* 2015;3(1):16.
66. Kato M, Natarajan R. MicroRNAs in diabetic nephropathy: Functions, biomarkers, and therapeutic targets. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1353(1):72-88.
67. Alvarez ML, DiStefano JK. The role of non-coding RNAs in diabetic nephropathy: Potential applications as biomarkers for disease development and progression. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013;99(1):1-11.
68. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: Discovery, recent

- applications, and next frontiers. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2011;717:1-29.
69. Ambros V. microRNAs. *Cell.* 2001;107(7):823-826.
  70. Jha A, Mehra M, Shankar R. The regulatory epicenter of miRNAs. *J Biosci.* 2011;36(4):621-638.
  71. Griffiths-Jones S, Saini HK, Van Dongen S, Enright AJ. miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(1):154-158.
  72. Igaz P. *Circulating MicroRNAs in disease diagnostics and their potential biological relevance.* Hungary: Springer. Vol 106; 2015.
  73. Çelik Aşçı D, Koşar Aslan P, Özçelik N. MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi. *20(3):121-127.*
  74. Rodwell V, Bender D, Botham K. B, Kennelly P. J, Weil P. A, . *Harpers Illustrated Biochemistry 30th Edition.* 2015: 409-410.
  75. Kim Y-K, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA , exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(13):1881-1889.
  76. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA. Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol Cell.* 2015;57(3):397-408. doi:10.1016/j.molcel.2014.11.030
  77. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):597-610.
  78. Creugny A, Fender A, Pfeffer S. Regulation of primary microRNA processing. *FEBS Lett.* 2018;592(12):1980-1996.
  79. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.* 2015;16(7):421-433.
  80. Sohel MH. Extracellular/circulating microRNAs: Release mechanisms, functions and challenges. *Achiev Life Sci.* 2016;10(2):175-186.
  81. Kappel A, Keller A. MiRNA assays in the clinical laboratory: Workflow, detection technologies and automation aspects. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(5):636-647.
  82. Duttgupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One.* 2011;6(6):1-14.
  83. Qian Y, Feldman E, Pennathur S, Kretzler M, Brosius FC. From fibrosis to sclerosis: Mechanisms of glomerulosclerosis in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2008;57(6):1439-1445.
  84. Zhong X, Chung ACK, Chen HY, et al. miR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2013;56(3):663-674.
  85. Kato M, Putta S, Wang M, et al. TGF- $\beta$  activates Akt kinase via a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nat Cell Biol.* 2010;11(7):881-889.

86. Zheng Zhang a, b, Huimin Peng a, b, Junxia Chen a, b XC c, A FH, A XX, A, Xiaoyan He, A NY. MicroRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice.
87. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. 2009;15(2):272-284.
88. Aslan D. Discovery of Biomarkers of Diabetes type 1 and type 2. Peplow P, Adams J, Tim Young T. (Editors). Cardiovascular and Metabolic Disease: Scientific Discoveries and New Therapies, 22 May 2015, 219-253.
89. Qiagen. miRNeasy Serum Plasma Advanced Kit Handbook. 2017:1-52.
90. Qiagen. miRCURY® LNA® miRNA PCR Exosomes, Serum/Plasma and Other Biofluid Samples Handbook. Qiagen. 2017;1-64.
91. Erişim: ([www.mirbase.org/index.shtml](http://www.mirbase.org/index.shtml)) Erişim tarihi 28.02.2017.
92. Günel T, Aydın K. “ Real-Time PCR ” ve uygulama alanları. Türk Bilim Derlemeler Derg. 2009;2(2):43-45.
93. Wittwer CT, Kuskawa N. Nucleic acid techniques. Tietz Textb Clin Chem Mol Diagnostics. 2012;(3):401-442.
94. Wittwer, Carl T., Hermann, Mark G, Moss Alan A., Rasmussen RP. BioTechniques 30th Anniversary GEM IN IT IS Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle. Biotechniques. 1997;138.
95. Clinical T. High resolution melting method in molecular diagnostics and their Clinical Importance. 2017:20-26.
96. Günel T. Gen anlatımının kantitatif analizi “Real-Time PCR.” Türkiye Klin. 2007;27:763-767.
97. Marabita F, De Candia P, Torri A, Tegnér J, Abrignani S, Rossi RL. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. Brief Bioinform. 2016;17(2):204-212.
98. Nassirpour R, Raj D, Townsend R, Argyropoulos C. MicroRNA biomarkers in clinical renal disease: from diabetic nephropathy renal transplantation and beyond. Food Chem Toxicol. 2016;98:73-88.
99. Neal CS, Michael MZ, Pimlott LK, Yong TY, Li JYZ, Gleadle JM. Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. 2011;26(11):3794-3802.
100. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. RNA Biol. 2011;8(5):706-713.
101. Lv L-L, Cao Y-H, Ni H-F, et al. MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. AJP Ren Physiol. 2013;305(8):1220-1227.
102. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. Circ Res. 2010;107(6):810-817.
103. Chien HY, Chen CY, Chiu YH, Lin YC, Li WC. Differential microRNA profiles predict diabetic nephropathy progression in Taiwan. Int J Med Sci.



- 2016;13(6):457-465.
104. Connolly JH, Herriott RM, Gupta S. Ribonuclease in normal and uraemic Human Blood. *Br J Exp Pathol.* 1962;43(4):402-408.
  105. Jazbutyte V, Thum T. MicroRNA-21: From cancer to cardiovascular disease. *Curr Drug Targets.* 2010;11(8):926-935.
  106. Tang X, Tang G, Özcan S. Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2008;1779(11):697-701.
  107. Ling HY, Ou HS, Feng SD, et al. Changes in microRNA (mir) profile and effects of mir-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36(9):32-39.
  108. Li YF, Jing Y, Hao J, et al. MicroRNA-21 in the pathogenesis of acute kidney injury. *Protein Cell.* 2013;4(11):813-819.
  109. Takahashi P, Xavier DJ, Evangelista AF, et al. MicroRNA expression profiling and functional annotation analysis of their targets in patients with type 1 diabetes mellitus. *Gene.* 2014;539(2):213-223.
  110. Zhang Y, Sun X, Icli B, Feinberg MW. Emerging roles for microRNAs in diabetic microvascular disease: Novel targets for therapy. *Endocr Rev.* 2017;38(2):145-168.
  111. Kölling M, Kaucsar T, Schauerte C, et al. Therapeutic miR-21 Silencing Ameliorates Diabetic Kidney Disease in Mice. *Mol Ther.* 2017;25(1):165-180.
  112. Wang J, Gao Y, Ma M, et al. Effect of miR-21 on renal fibrosis by regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay diabetic nephropathy Mice. *Cell Biochem Biophys.* 2013;67(2):537-546.
  113. Kanwar YS, Wada J, Sun L, et al. Diabetic nephropathy: Mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med.* 2008;233(1):4-11.
  114. Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: The case for TGF- $\beta$  as the Major Mediator. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(90010):55S-57.
  115. Lan HY. Transforming growth factor- $\beta$ /Smad signalling in diabetic nephropathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012;39(8):731-738.
  116. Hayashida T. It's a Smad World: Regulation of TGF- $\beta$  Signaling in the Kidney. 2002;(18):1126-1128.
  117. Ling HY, Hu B, Hu XB, et al. MiRNA-21 reverses high glucose and high insulin induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through targeting phosphatase and tensin homologue. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012;120(9):553-559.
  118. Lai JY, Luo J, O'Connor C, et al. MicroRNA-21 in Glomerular injury. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(4):805-816.
  119. Szeto CC, Ching-Ha KB, Ka-Bik L, et al. Micro-RNA expression in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases. *Dis Markers.* 2012;33(3):137-144.
  120. Kong L, Zhu J, Han W, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study. *Acta Diabetol.*

- 2011;48(1):61-69.
121. Jaeger A, Zollinger L, Saely CH, et al. Circulating microRNAs -192 and -194 are associated with the presence and incidence of diabetes mellitus. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-14.
  122. Zhang Y, Huang XR, Wei LH, Chung AC, Yu CM, Lan HY. MiR-29b as a therapeutic agent for angiotensin ii-induced cardiac fibrosis by targeting TGF- $\beta$ /Smad3 signaling. *Mol Ther.* 2014;22(5):974-985.
  123. Slusarz A, Pulakat L. The two faces of miR-29. *J Cardiovasc Med.* 2015;16(7):480-490.
  124. Kanasaki K, Shi S, Kanasaki M, et al. Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in a therapeutic regimen. *Diabetes.* 2014;63(6):2120-2131.
  125. Miao C, Xiong Y, Zhang G, Chang J. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis, new research progress and their pathophysiological implication. *Exp Lung Res.* 2018;44(3):178-190.
  126. Hyun J, Jung Y. MicroRNAs in liver fibrosis: Focusing on the interaction with hedgehog signaling. *World J Gastroenterol.* 2016;22(29):6652-6662.
  127. Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(35):13027-13032.
  128. Sassi Y, Avramopoulos P, Ramanujam D, et al. Cardiac myocyte miR-29 promotes pathological remodeling of the heart by activating Wnt signaling. *Nat Commun.* 2017;8(1):1-11.
  129. Harmanci D, Erkan E, Kocak A, Akdogan G. Role of the microRNA-29 family in fibrotic skin diseases (Review). *Biomed Reports.* 2017:599-604.
  130. Wei Qin, Arthur C.K. Chung HYL. TGF- $\beta$ /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by Inhibiting miR-29. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(8):1462-1474.
  131. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics.* 2012;44(4):237-244.
  132. Qi Y, Huang Y, Pang L, et al. Prognostic value of the MicroRNA-29 family in multiple human cancers: A meta-analysis and systematic review. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44(4):441-454.
  133. Xu R. MiR-29 / Hsp47 in ECM network. *Oncoscience* 2015;2(10):2010-2011.
  134. Du B, Ma LM, Huang MB, et al. High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells. *FEBS Lett.* 2010;584(4):811-816.
  135. Luna C, Li G, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P. Cross-talk between miR-29 and transforming growth factor-betas in trabecular meshwork cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(6):3567-3572.
  136. Mott JL, Kurita S, Cazanave S, Bronk SF, Nathan W, Fernandez-zapico ME.

- Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB. *Cell*. 2011;110(5):1155-1164.
137. Chen HY, Zhong X, Huang XR, et al. MicroRNA-29b inhibits diabetic nephropathy in db/db mice. *Mol Ther*. 2014;22(4):842-853.
  138. Votanopoulos KI, Newman NA, Russell G. Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes. *NIH*. 2014;20(March 2012):1-13.
  139. Argyropoulos C, Wang K, McClarty S, et al. Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 Diabetes. *PLoS One*. 2013;8(1).
  140. Gondaliya P, Dasare A, Srivastava A, Id KK. miR29b regulates aberrant methylation in in vitro diabetic nephropathy model of renal proximal tubular cells. 2018;1:1-22.
  141. Jia Y, Guan M, Zheng Z, et al. MiRNAs in urine extracellular vesicles as predictors of early-stage diabetic nephropathy. *J Diabetes Res*. 2016;2016.
  142. Yang X, Liu S, Zhang R, et al. Microribonucleic acid-192 as a specific biomarker for the early diagnosis of diabetic kidney disease. *J Diabetes Investig*. 2018;9(3):602-609.
  143. Liu Y, Gao G, Yang C, et al. The role of circulating microRNA-126 (miR-126): A novel biomarker for screening prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):10567-10577.
  144. Sun Y, Koo S, White N, et al. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(22).
  145. Mao Y, Mohan R, Zhang S, Tang X. MicroRNAs as pharmacological targets in diabetes. *Pharmacol Res*. 2013;75:37-47.
  146. Kantharidis P, Wang B, Carew RM, Lan HY. Diabetes complications: The microRNA perspective. *Diabetes*. 2011;60(7):1832-1837.
  147. Khella HWZ, Bakhiet M, Allo G, et al. mir-192, mir-194 and miR-215: A convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2013;34(10):2231-2239.
  148. Kato M. Noncoding RNAs as therapeutic targets in early stage diabetic kidney disease. 2018;2018(3):197-209.
  149. Wang B, Herman-Edelstein M, Koh P, et al. E-cadherin expression is regulated by miR-192/215 by a mechanism that is independent of the profibrotic effects of transforming growth factor- $\beta$ . *Diabetes*. 2010;59(7):1794-1802.
  150. Liang MY, Tian ZM, Greene AS, Pietrusz JL, Matus IR. MicroRNA-target pairs in the rat kidney identified by microRNA microarray, proteomic, and bioinformatic analysis. *Genome Res*. 2008;18(3):404-411.
  151. Ma X, Lu C, Lv C, Wu C, Wang Q. The Expression of miR-192 and Its significance in diabetic nephropathy patients with different urine albumin creatinine ratio. *J Diabetes Res*. 2016;2016.

152. Karolina DS, Armugam A, Sepramaniam S, Jeyaseelan K. MiRNAs and diabetes mellitus. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2012;7(3):281-300.
153. Hagiwara S, McClelland A, Kantharidis P. MicroRNA in diabetic nephropathy: Renin angiotensin, AGE/RAGE, and oxidative stress pathway. *J Diabetes Res.* 2013;2013.
154. Beltrami C. The identification of miRNA biomarkers of chronic kidney disease and development of minimally-invasive methods of molecular detection. 2014.
155. Wang H, Cai J, A. The role of microRNAs in heart failure. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1863(2017):2019-2030.
156. Shang J, Li J, Keller MP, et al. Induction of miR-132 and miR-212 Expression by Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) in rodent and human pancreatic beta-Cells. *Mol Endocrinol.* 2015;29(9):1243-1253.
157. Soni MS, Rabaglia ME, Bhatnagar S, et al. Downregulation of carnitine acyl-carnitine translocase by miRNAs 132 and 212 amplifies glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes.* 2014;63(11):3805-3814.
158. Hagiwara S, McClelland A, Kantharidis P. MicroRNA in diabetic nephropathy : Renin angiotensin , AGE/RAGE , and oxidative Stress Pathway. *J Diabetes Res.* 2013;2013:1-11.
159. Feng B, Chakrabarti S. miR-320 Regulates glucose-induced gene expression in Diabetes. *ISRN Endocrinol.* 2012;2012:1-6.
160. Wang XH, Qian RZ, Zhang W, Chen SF, Jin HM, Hu RM. MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36(2):181-188.
161. Liu L, Yan J, Xu H, et al. Two novel MicroRNA biomarkers related to  $\beta$ -Cell damage and their potential values for early diagnosis of type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(4):1320-1329.
162. Bijkerk R, Duijs JMGJ, Khairoun M, et al. Circulating MicroRNAs associate with diabetic nephropathy and systemic microvascular damage and normalize after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2015;15(4):1081-1090.
163. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(12):5003-5008.
164. Glinge C, Clauss S, Boddum K, et al. Stability of circulating blood-based microRNAs-Pre-Analytic methodological considerations. *PLoS One.* 2017;12(2):1-16.
165. Cheng HH, Yi HS, Kim Y, et al. Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels. *PLoS One.* 2013;8(6):1-11
166. Cheng L, Sharples R a, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell vesicles.* 2014;3:1-14.