



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DİYABETİK AYAK GELİŞEN HASTALARDA ANGIOPOİETİN
BENZERİ PROTEİN-4 VE FOLLİSTATİN BENZERİ 1 PROTEİN
DÜZEYLERİ İLE ANGIOPOİETİN BENZERİ PROTEİN-4 GEN
POLİMORFİZMİ**

Dr. Rıza Gökhan BAYKAL

**UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.**

ANKARA

2019



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DİYABETİK AYAK GELİŞEN HASTALARDA ANGIOPOİETİN
BENZERİ PROTEİN-4 VE FOLLİSTATİN BENZERİ 1 PROTEİN
DÜZEYLERİ İLE ANGIOPOİETİN BENZERİ PROTEİN-4 GEN
POLİMORFİZMİ**

Dr. Rıza Gökhan BAYKAL

**UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Tomris ERBAŞ**

**ANKARA
2019**

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her aşamasında ve uzmanlık eğitimim boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, engin tecrübesi ve değerli bilgileri ile her zaman yanımda olan çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Tomris Erbaş'a teşekkür ederim.

Çalışma süresi boyunca karşıma çıkan zorluklar karşısında yol gösteren ve çalışmamın genetik kısmında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet Alikışıfoğlu'na ve Biyolog Serkan Kabaçam'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın biyokimyasal analiz kısmında destek olan ve değerli bilgilerini paylaşan Prof. Dr. İncilay Lay'a ve Biyolog Yasin Kıran'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın istatistiksel değerlendirmesinde yardım ve katkılarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı araştırma görevlisi Merve Kaşıkçı'ya ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyoinformatik Anabilim Dalı araştırma görevlisi Can Koşukçu'ya teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında benden yardım ve desteklerini esirgemeyen tüm Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları ailesine ve katkılarından ötürü Metin Ödevci'ye içtenlikle teşekkür ederim.

Tez dönemimde ve uzmanlık eğitim sürecimde yaşadığım tüm sıkıntılarda bir an bile desteklerini esirgemeyen ve beni bu tezi yazabilecek günlere getiren aileme de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: THD-2019-18048).

ÖZET

Rıza Gökhan Baykal. Diyabetik ayak gelişen hastalarda Angiopoietin benzeri protein-4 ve Follistatin benzeri 1 protein düzeyleri ile Angiopoietin benzeri protein-4 gen polimorfizmi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi, ANKARA, 2019.

Angiopoietin benzeri protein-4 (ANGPTL-4) yara iyileşmesi, lipid ve glukoz metabolizmasında önemli rol oynayan bir angiopoietin benzeri proteindir. Follistatin benzeri 1 (FSTL1) protein ise angiogenez ve inflamasyonda etkileri olan bir kardiyokindir. Bu çalışmanın amacı diyabetik ayak tanısı ile takip edilen Tip 2 diyabetik hastalarda ANGPTL-4 ve FSTL1 düzeyleri ile ANGPTL-4 genindeki rs4076317 ve rs1044250 tek nükleotid polimorfizmlerinin (TNP) ilişkisini değerlendirmektir. Bu çalışmaya diyabetik ayak tanısı ile izlenen 60 Tip 2 diabetes mellituslu hasta (Grup 1), diyabetik ayak sorunu olmayan 70 Tip 2 diabetes mellituslu hasta (Grup 2) ve 53 sağlıklı birey kontrol grubu (Grup 3) olarak alındı. TNP analizi Sanger yöntemi kullanılarak yapıldı. ANGPTL-4 ortalaması grup 1’de 12.32 ± 5.58 ng/mL, grup 2’de 9.49 ± 2.88 ng/mL, grup 3’te 8.33 ± 3.15 ng/mL idi ve aralarındaki fark anlamlıydı ($p < 0.001$). ANGPTL-4 ortalamaları proliferatif retinopatisi, periferik duyuşal nöropatisi, nefropatisi, hipertansiyonu, koroner arter hastalığı ve periferik arter hastalığı olan diyabetik hastalarda olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksekti. Gruplar arasında her iki TNP genotiplerinin dağılımı açısından bir fark yoktu. Diyabetik hastalarda rs1044250 CT genotipi olanlarda hipertansiyon sıklığı CC/TT olanlara göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0.001$). FSTL1 seviyesi grup 1’de 972.22 (799.83-1695.45) pg/mL, grup 2 ve 3’te 843.54 (680.02-1099.67) pg/mL idi ve aradaki fark anlamlıydı ($p = 0.003$). ANGPTL-4 genindeki rs1044250 ve rs4076317 TNP’lerin diyabetik ayak için moleküler bir risk oluşturmadıkları saptandı. Bu çalışmada ANGPTL-4 seviyelerinin diyabetik hastalarda komplikasyonları göstermede bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterildi.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, diyabetik ayak, ANGPTL-4, FSTL1, visseral adipozite indeksi

Destekleyen Kuruluş: H. Ü. B. A. B. THD-2019-18048

ABSTRACT

Baykal R.G. Angiotensin-like protein-4 and Follistatin-like 1 protein levels and Angiotensin-like protein-4 gene polymorphism in patients with diabetic foot. Hacettepe University Medical School, Internal Medicine Specialty Thesis, ANKARA, 2019.

Angiotensin-like protein-4 (ANGPTL-4) is an angiotensin-like protein that plays an important role in wound healing, lipid and glucose metabolism. Follistatin-like 1 (FSTL1) is a cardiokin with effects on angiogenesis and inflammation. The aim of this study was to evaluate the relationship between ANGPTL-4 and FSTL1 levels and rs4076317 and rs1044250 single nucleotide polymorphisms (SNP) in the ANGPTL-4 gene in Type 2 diabetic patients with diabetic foot. Sixty patients with type 2 diabetes mellitus with diabetic foot (Group 1), 70 patients with type 2 diabetes mellitus without diabetic foot (Group 2) and 53 healthy subjects (Group 3) were included in this study. SNP analysis was performed using Sanger method. The mean ANGPTL-4 was 12.32 ± 5.58 ng/mL in group 1, 9.49 ± 2.88 ng/mL in group 2, 8.33 ± 3.15 ng/mL in group 3, and the difference was significant ($p < 0.001$). The mean ANGPTL-4 was significantly higher in diabetic patients with proliferative retinopathy, peripheral sensory neuropathy, nephropathy, hypertension, coronary artery disease, and peripheral arterial disease than those without. There was no difference between the groups in terms of the distribution of both SNP genotypes. The prevalence of hypertension was significantly higher in diabetic patients with rs1044250 CT genotype than CC/TT ($p < 0.001$). The FSTL1 level was 972.22 (799.83-1695.45) pg/mL in group 1, 843.54 (680.02-1099.67) pg/mL in groups 2 and 3, and the difference was significant ($p = 0.003$). Rs1044250 and rs4076317 SNPs in the ANGPTL-4 gene did not constitute a molecular risk for diabetic foot. In this study, it was shown that ANGPTL-4 levels could be used as a biomarker to show complications in diabetic patients.

Key words: Diabetes mellitus, diabetic foot, ANGPTL-4, FSTL1, visceral adiposity index

Supported by H. U. B. A. B. THD-2019-18048

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
GRAFİKLER	ix
TABLO DİZİNİ	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diyabetik ayak	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Patogenez	4
2.1.3. Genetik	6
2.2. Angiopoietin Benzeri Proteinler	7
2.3. Angiopoietin Benzeri Protein- 4 (ANGPTL-4)	8
2.3.1. ANGPTL-4'ün Keşfi ve Genel Bilgiler	8
2.3.2. ANGPTL-4 ve Lipid Metabolizmasına Etkileri.....	10
2.3.3. ANGPTL-4 ve Glukoz Metabolizmasına Etkileri.....	11
2.3.4. ANGPTL-4 ve Diyabet Komplikasyonları ile İlişkisi.....	13
2.3.5. ANGPTL-4 Tek Nükleotid Polimorfizm Çalışmaları	14
2.4. Follistatin Benzeri 1 (FSTL1) Protein	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Araştırmanın Tipi ve Amacı	20
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	20
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme	20
3.4. Kullanılan Gereçler	21
3.4.1. Visseral Adipozite İndeksi	25
3.4.2. Framingham Risk Skoru.....	26
3.4.3. ANGPTL-4 Gen Polimorfizm Analizi	26
3.4.3.1 Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu ve DNA Kalite Analizi.....	26
3.4.3.2 Sanger Yöntemi ile ANGPTL-4 Geni DNA Dizi Analizi.....	26
3.5. Araştırmanın Etik Yönü	27
3.6. İstatistiksel Analiz	27
4. BULGULAR	29
4.1. Demografik, Antropometrik Veriler ve Laboratuvar Sonuçları	29
4.2. ANGPTL-4 Sonuçları	35
4.3. FSTL1 Sonuçları	41
4.4. Gen Polimorfizm Sonuçları	45
4.4.1. ANGPTL-4 rs4076317 Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları	45
4.4.2. ANGPTL-4 rs1044250 Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları	45
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	63

EK-1: ETİK KURUL ONAYI.....	78
------------------------------------	-----------

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADD	Adipoz Doku Disfonksiyonu
ANGPTL-4	Angiopietin Benzeri Protein-4
AGE	Advanced Glycation End Products (İleri Glikasyon Son Ürünleri)
BÇ	Bel Çevresi
BUN	Blood Urea Nitrogen (Kan Üre Nitrojeni)
DM	Diabetes Mellitus
ER	Endoplazmik Retikulum
FSTL1	Follistatin Benzeri 1 Protein
HDL	High Density Lipoprotein (Yüksek Dansiteli Lipoprotein)
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
LDL	Low Density Lipoprotein (Düşük Dansiteli Lipoprotein)
LPL	Lipoprotein Lipaz
MMP	Matriks Metalloproteinaz
PPAR	Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör
SVO	Serebrovasküler Olay
TGF	Transforming Büyüme Faktörü
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNP	Tek Nükleotid Polimorfizm
VAC	Vacuum Assisted Closure (Vakum Destekli Kapama)
VAİ	Visseral Adipozite İndeksi
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VKİ	Vücut Kütle İndeksi

GRAFİKLER

Grafik 1: Graplarda ANGPTL-4 Düzeyleri

Grafik 2: Wagner Evrelerine Göre ANGPTL-4 Düzeyleri

Grafik 3: Graplarda FSTL1 Düzeyleri

Grafik 4: Wagner Evrelerine Göre FSTL1 Düzeyleri

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Wagner Evrelemesi

Tablo 2: Adipoz Doku Disfonksiyonunun Yaşa Göre Sınıflandırılması

Tablo 3: Demografik, Antropometrik Veriler ve Laboratuvar Sonuçları

Tablo 4: Diyabetik Ayak Tanısı Olan ve Olmayan Diyabetik Hastalarda
Komplikasyonların Dağılımı

Tablo 5: Diyabetik Ayak Tanısı Olan Diyabetik Hastaların Özellikleri

Tablo 6: Diyabetik Komplikasyonları Olan ve Olmayan Hastalarda ANGPTL-4
Düzeyleri

Tablo 7: Diyabetik Komplikasyonları Olan ve Olmayan Hastalarda FSTL1
Düzeyleri

Tablo 8: Diyabetik Ayak Tanısı Olan ve Olmayan Tip 2 DM'li Hastalarda
ANGPTL-4 rs4076317 ve rs1044250 Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Genotip ve
Allel Dağılımları

Tablo 9: Tip 2 DM Tanısı Olan Hastalarda ve Kontrol Grubunda ANGPTL-4
rs4076317 ve rs1044250 Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Genotip ve Allel
Dağılımları

Tablo 10: Diyabetik Hastalarda ANGPTL-4 rs1044250 Tek Nükleotid Polimorfizmi
CT ve CC/TT Genotiplerinde Laboratuvar Bulguları ve Diyabetik Komplikasyonların
Sıklığı

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Diabetes mellitus (DM) endotel disfonksiyonu ve vasküler inflamasyona yol açarak retinopati, nefropati, periferik, duyuşal ve otonom nöropati ile kardiyovasküler hastalık oluşumuna neden olan kronik bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre diabetes mellitus dünyada 422 milyon erişkinde görölmektedir, 2045 yılında ise 693 milyona çıkması öngörülmektedir (1, 2). Doğrudan diabetes mellitusun etkisi ile 2016 yılında 1.6 milyon ölümin gerçekleştiği bildirilmiştir (1).

Diabetes mellitus retinopati, periferik duyuşal ve otonom nöropati, nefropati, koroner arter hastalığı, hipertansiyon, periferik arter hastalığı ve diyabetik ayak gibi mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlara yol açmaktadır. Diabetes mellitus görölme sıklığının artması ile birlikte diyabet komplikasyonlarının görölme oranlarının da artması beklenmektedir. Diyabetik hastalarda görölen mortalite başta kardiyovasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalık, kronik böbrek hastalığı ve enfeksiyonlara bağlıdır.

Diabetes mellituslu hastalarda diyabetik ayak ülserleri hastaneye yatışın en önemli nedenlerinden biridir ve görölme oranı gün geçtikçe artmaktadır (3). Diyabetik ayak ülserinin yıllık insidansı diyabetik hastalarda %2-5 arasındadır. Çeşitli çalışmalarda yaşam boyu görölme riskinin %15-25 arasında olduğu bildirilmiştir (4, 5). Diyabetik ayak ülserleri alt ekstremitte amputasyonlarının en önemli nedenlerinden biridir. Bu durum diabetes mellituslu hastalar ve toplum için önemli bir sosyal ve ekonomik bir yük getirmektedir (6).

Diyabetik hastalarda gelişen mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların temel nedeni mikrosirkülatuar disfonksiyon ve vasküler inflamasyondur (7). Diabetes mellitus yara iyileşmesi sürecine katılan hücreleri ile sitokin ve büyüme faktörlerinin ekspresyonunu etkilemektedir (8).

Angiopietin benzeri protein-4 (ANGPTL-4) yara iyileşmesinin reepitelizasyon basamağı ile lipid ve glukoz metabolizmasında önemli rol oynayan angiopietin benzeri bir proteindir (9).

Diyabetik ayak ülserlerinin gelişiminde genetik değişiklikler önemli rol oynamaktadır. Diabetes mellitus yara iyileşmesinde keratinosit migrasyonunda defektlere yol açtığından reepitelizasyon basamağını olumsuz yönde etkilemektedir. Reepitelizasyon ile ilgili genler arasında ANGPTL-4 geni lipid homeostazisi, glukoz metabolizması, inflamasyon ve enerji homeostazisinde potansiyel etki göstermektedir (10). Reepitelizasyon ile ilgili genler ile yapılacak çalışmalar yara iyileşmesinde tedavi yaklaşımları ile ilgili önemli katkılar sağlayabilir.

ANGPTL-4 genindeki çeşitli polimorfizmlerin serum lipid profili, metabolik sendrom, koroner arter hastalığı ile ilişkisi gösterilmiştir (11-14).

FSTL1, transforming büyüme faktörü (TGF) beta tarafından salınımı indüklenen vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonunu etkileyen glikoprotein yapıda bir kardiyokindir (15). FSTL1'in inflamasyon ve yara iyileşmesi üzerinde etkileri mevcuttur (10). FSTL1 ekspresyonu kardiyovasküler hastalıklar, sistemik otoimmün hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalıkta değiştiği bilinmektedir.

Diabetes mellituslu hastalarda ANGPTL-4 ve FSTL1 ile diyabetik ayak ve diyabetik komplikasyonlar arasındaki ilişkiyi gösteren literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ANGPTL-4 rs4076317 ve rs1044250 tek nükleotid polimorfizmleri ile ANGPTL-4 ve FSTL1 düzeylerinin diyabetik ayak ve diyabetik komplikasyonlar ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabetik ayak

2.1.1. Epidemiyoloji

Diyabetik ayak ülserleri diabetes mellitusun morbidite ve mortaliteye neden olan önemli bir komplikasyonudur. Diyabetik ayak insidansı diabetes mellitus görülme sıklığının ve diyabetik hastaların yaşam beklentisinin uzamasından dolayı artmaktadır.

Yapılan bir meta-analizde diyabetik ayak ülser prevalansının tüm dünyada %6.3 olduğu bildirilmiştir. Tip 2 DM tanılı hastalarda prevalans %6.4, Tip 1 DM tanılı hastalarda ise %5.5 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada Türkiye'deki prevalansın %3.1 olduğu, erkeklerde %4.5, kadınlarda ise %3.5 olduğu belirtilmiştir. Diyabetik ayak ülserinin yıllık insidansı ise %2-5 arasındadır ve yaşam boyu görülme riski %15-25 arasındadır (4, 5).

Diabetes mellitustan dolayı her 30 saniyede bir alt ekstremitte amputasyonu yapılmaktadır (16). İlk diyabetik ayak ülserinden bir yıl sonra amputasyon olasılığı %34.1, mortalite oranı ise %5.5 olarak bildirilmiştir (17).

Diyabetik ayak ülseri olan hastaların olmayanlara göre daha yaşlı, diyabet sürelerinin daha uzun, vücut kütle indekslerinin (VKİ) daha düşük, hipertansiyon, diyabetik retinopati görülme oranlarının ve sigara içiminin daha fazla olduğu gösterilmiştir (18).

Diyabetik ayak ülseri tedavisi için maliyetler oldukça yüksektir ve her geçen gün artmaktadır. Diabetes mellitus ve komplikasyonlarının tedavisi için yapılan toplam harcamaların yaklaşık %33'ü diyabetik ayak ülserlerinin tedavisi için yapılmaktadır (19). Diabetes mellituslu hastalarda diyabetik ayak ülserleri hastaneye

yatışın en önemli nedenlerindendir ve maliyetinin her bir olay başına 40.000 doları geçtiği bildirilmiştir (3).

Diyabetik ayak ülserleri ve amputasyonları hastaların yaşam kalitesini ciddi biçimde düşürmektedir.

2.1.2. Patogenez

Diyabetik ayak ülserleri dermis ve daha derin dokulara yayılabilen epitel kaybını içeren lezyon ve abrazyonlar olarak tanımlanır. Diyabetik ayak ülserleri bazen kemik ve kas dokuya kadar ilerleyebilmektedir (20). Diyabetik ayak ülserlerinin etyolojisi multifaktöriyeldir, genetik ve çevresel faktörleri içermektedir (21).

Normal yara iyileşme süreci inflamasyon, proliferasyon ve remodelling olmak üzere 3 fazlıdır. İnflamasyon fazında vasküler permeabilite artar ve inflamatuvar hücreler hasarlı dokuda ekstraselüler boşluğa geçerler. İnflamatuvar hücreler yara bölgesindeki bakterileri yok ederler ve ölü hücre kalıntılarını temizlerler. Nötrofil, makrofaj ve lenfositler bu süreçte önemli rol oynamaktadır. Makrofajlardan anjiogenezde, fibroblast migrasyonunda ve kollajen üretiminde görev alan sitokinler salgınır. Diabetes mellitusta nötrofil ve makrofajların fonksiyonları bozulmaktadır. Ayrıca lenfositlerin erken apoptozu yara iyileşme sürecini geciktirmektedir (10, 22).

Proliferasyon fazında ise anjiogenez, granülasyon dokusu oluşumu, epitelizasyon, kollajen birikimi ve yara kontraksiyonu gerçekleşmektedir (23). Anjiogenezde vasküler endotelial hücreler tarafından yeni damarlar oluşturulur. Yara bölgesine hücrelerin migrasyonu ve proliferasyonu çeşitli sitokinler ve büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır (10).

Remodelling fazında kollajen sentezi ile birlikte yaranın gerilme direnci artar. Bu faz boyunca aşırı kollajen üretimini önlemek için matriks metalloproteinazları görev alır. Remodelling fazındaki gelişmeler sonucu hasardan üç ay sonra gerilme direnci normal dokunun yarısına ulaşır (10, 24).

Diabetes mellitusta yara iyileşmesi sürecinde birçok faktörden dolayı aksamalar meydana gelmektedir (10). Diabetes mellitus yara iyileşmesi sürecine katılan sitokin ve büyüme faktörlerinin ekspresyonunu etkilemektedir (25). Hiperglisemi hücre içinde reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna ve lenfosit apoptozunda artışa yol açmaktadır (22). Diabetes mellitusta immün sistemde görülen değişiklikler uzamış enfeksiyona ve kronik inflamasyona neden olmaktadır. Bu da proliferasyonda azalma ve remodelling fazında aksamalara yol açmaktadır (26).

Yara iyileşmesinde reepitelizasyon ile epidermal bariyerin tamiri oldukça önemlidir. Keratinosit migrasyonu ve proliferasyonu reepitelizasyon için önemli basamaklardır. Diyabetik hastalarda yüksek kan şekeri düzeyleri keratinositlerin migrasyonunu ve proliferasyon kapasitelerini azaltmakta ve bu durum yetersiz reepitelizasyona yol açmaktadır (27). Reepitelizasyon ile ilişkili genetik faktörlerden biri FSTL1 messenger RNA'sında yer alan primat spesifik ekzonik microRNA-198 (miR-198)'dir. FSTL1 hücre proliferasyonunda, migrasyonunda ve immün yanıtın düzenlenmesinde etkisi olan bir glikoproteindir (28). FSTL1 geni tarafından kodlanan miR-198 keratinosit migrasyonunu inhibe etmekte ve yara iyileşmesini bozmaktadır (29). Yara iyileşmesi üzerindeki etkileri FSTL1'in diyabetik ayak patogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Keratinosit migrasyonunda ve reepitelizasyon sürecinde etkisi olan bir diğer glikoprotein ANGPTL-4'tür. ANGPTL-4'ün C-terminal formunun hücre migrasyonu ve angiogeneze görevleri vardır. ANGPTL-4 ekspresyonu doku hasarında hasarlı bölgede artmaktadır. Buna karşın diyabetik yaraların iyileşme süreci boyunca düşük kalmaktadır (30). Keratinosit migrasyonu sürecinde ANGPTL-4 integrin- β 1 ile bağlanır. ANGPTL-4'ün integrin- β 1 ile bağlanması focal adhesion kinase (FAK)/Steroid receptor coactivator (Src)- p21 activated kinase 1 (PAK1) sinyal yolağını aktive eder. Bu yolağın hücre migrasyonunda önemli rolü olduğu bilinmektedir (31).

ANGPTL-4, vitronektin ve fibronektin ile etkileşerek yara bölgesindeki ekstraselüler matriksi düzenler. Bu etkileşim bu proteinlerin proteazlar tarafından

degradasyonunu önler. Fibronektin ve vitronektinin degradasyonunun gecikmesi integrin-matriks protein kompleksini stabilize etmektedir (10).

Peroxisom proliferatör aktive reseptör (PPAR) β/δ yara iyileşme sürecinde keratinosit proliferasyonu, migrasyonu ve hücre adezyonunda görev almaktadır (32). PPAR β/δ dermal fibroblastlarda IL-1 sinyalini düzenleyerek keratinosit proliferasyonunu kontrol eder ve reepitelizasyon boyunca epidermal diferansiyasyonu uyarır (33, 34). İnsan keratinositlerinde ANGPTL-4'ün PPAR β/δ 'ı upregüle ederek protein kinaz C ekspresyonunu ve aktivatör protein-1 transkripsiyon faktörlerini uyardığı gösterilmiştir (35).

2.1.3. Genetik

Diyabetik ayak ülserlerinde rol oynayan genetik faktörler tek nükleotid polimorfizmleri ve epigenetik mekanizmalardır. Tek nükleotid polimorfizmleri diyabetik ayak ülserleri iyileşmesinde rol oynayan büyüme faktörleri ve sitokinler üzerinde önemli bir role sahiptir (20). Tip 2 DM'nin diğer komplikasyonları ile kıyaslandığında diyabetik ayak ülserlerinin genetiği ile ilgili daha az sayıda çalışma yapılmıştır (36).

Yara iyileşmesi sürecinde rol alan sitokin ve kemokin genlerindeki çeşitli tek nükleotid polimorfizmleri yara iyileşmesinin fazlarını etkilemektedir (26).

Yapılan çalışmalarda yara iyileşme sürecinde önemli rol oynayan matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), interlekin-6 (IL-6), tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve stromal hücre kökenli faktör-1 (SDF-1) genlerindeki çeşitli polimorfizmler ile diyabetik ayak ülseri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (37-41).

MMP-9 genindeki bir TNP'nin (-1562C>T, rs3918242) Tip 2 DM ve diyabetik ayak ülseri ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (37). MMP-9 c.1562C>T gen polimorfizminin artmış plazma MMP-9 seviyesi ile ilişkisi olduğu ve diyabetik makroanjopatide prediktif bir marker olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (38).

VEGF genindeki TNP'lerle (-7*C/T, -2578*C/A) yapılan bir çalışmada A aleli taşıyanlarda diyabetik ayak ülseri sıklığının daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu koruyucu etki artmış anjiogenez ile ilişkilidir (39). Başka bir çalışmada VEGF genindeki rs699947 polimorfizminin diyabetik ayak ülseri görülmesi ile anlamlı ilişkisinin olduğu gösterilmiştir (40).

İnterlökin-6 (rs1800795), TNF- α (rs1800629), SDF-1 (rs1801157) genlerindeki TNP'ler ile diyabetik ayak ülseri arasında kuvvetli bir ilişki olduğu gösterilmiştir (41).

Diyabetik ayak ülserlerinde tek nükleotid polimorfizmlerinin ülser derecesini, enfeksiyonu ve amputasyonu da etkiledikleri gösterilmiştir. Viswanathan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada IL-6 (-174G>C), TNF- α (-174G>C) ve SDF-1 (+801G>A) genlerindeki TNP'lerin ciddi yara enfeksiyonu için risk faktörü oldukları gösterilmiştir. TNF- α (-174G>C) ve (-238G>A) polimorfizmleri ülser evresi için, SDF-1 genindeki (+801G>A) bir polimorfizm ise amputasyon için majör risk faktörü olarak bulunmuştur (26).

Literatürde yara iyileşme sürecinde önemli görevler alan ANGPTL-4 genindeki polimorfizmler ile diyabetik ayak ilişkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır.

2.2. Angiopoietin Benzeri Proteinler

Angiopoietin benzeri proteinler angiopoietin ailesindeki proteinlerle yapısal olarak benzerlik taşıyan sekiz adet glikoproteindir. Angiopoietin ve angiopoietin benzeri protein ailesindeki proteinler iki bölgeden oluşurlar: N-terminal coiled-coil bölgesi ve C-terminal fibrinojen benzeri bölgesi. N-terminal bölgesi oligomerizasyona eşlik eder. C-terminal bölgesi ise Tie2 reseptörüne bağlanır. İstisna olarak ANGPTL-8'in C-terminal bölgesinin olmadığı gösterilmiştir (42).

Angiopoietinler endotel ve erken dönem hematopoietik hücrelerde eksprese edilen tirozin kinaz yapısında Tie1 ve Tie2 reseptörlerine bağlanırlar. Bu reseptörler angiogenezde ve vasküler bütünlüğün ve permeabilitenin korunmasında önemli rol oynar (43). Angiopoietinler ve angiopoietin benzeri proteinler yapısal olarak benzerlik taşımalarına rağmen angiopoietin benzeri proteinler Tie1 ve Tie2 reseptörlerine bağlanmazlar. Angiopoietinlerden önceden orfan ligand olarak bahsedilmekle birlikte yapılan çalışmalarda bazılarının reseptörleri gösterilmiştir (42, 44-47). Lökosit immunoglobulin benzeri reseptörlerin (LILR) -diğer isimleri ile CD85 veya immunoglobulin benzeri transkriptler- ANGPTL-2, 5 ve 7'nin reseptörleri olduğu gösterilmiştir (46).

Angiopoietin benzeri proteinler karaciğer, adipöz doku, iskelet kası, kalp, bağırsaklar, böbrek, plasenta gibi birçok dokudan eksprese edilmektedir. Angiogenez, inflamasyon, lipid ve glukoz metabolizması ve yara iyileşmesinde önemli görevleri vardır.

2.3. Angiopoietin Benzeri Protein- 4 (ANGPTL-4)

2.3.1. ANGPTL-4'ün Keşfi ve Genel Bilgiler

ANGPTL-4 2000'de 3 farklı araştırma grubu tarafından keşfedilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda ANGPTL-4 fasting-induced adipose factor (FIAF), hepatic fibrinogen/angiopoietin-related protein (HFARP), peroxisome proliferator-activated-receptor- γ angiopoietin-related protein (PGAR) olarak isimlendirilmiştir (48-50).

ANGPTL-4 başlıca karaciğerde olmak üzere adipöz doku, plasenta ve ince bağırsaklarda üretilip dolaşıma sekrete edilir. Moleküler kütlesi yaklaşık 50 kilodaltondur (51-53). ANGPTL-4 sekrete edildikten sonra proteolize uğrar ve N-terminal formu ile C-terminal formu oluşur. Dolaşıma tam uzunluktaki ANGPTL-4 formu, N-terminal formu ve C-terminal formu sekrete edilir. Tam uzunluktaki formu adipöz dokudan, N-terminal formu ise başlıca karaciğerden sekrete edilir (30, 54).

ANGPTL-4 ekspresyonu karaciğer ve yağ dokusunda açlık ve tokluk sonrası değişmektedir. ANGPTL-4 lipid depolanması ve yıkımında önemli rol oynamaktadır. Trigliseridden zengin plazma lipoproteinlerini parçalayan lipoprotein lipazın (LPL) dimerizasyonunu bozarak onu inhibe eder (55). Lipoprotein lipaz aktivitesi ANGPTL-4'ün N-terminal formu ile ilişkilidir. C-terminal formu yağ dokusunda lipolizi uyarmakta ve enerji harcanmasını artırmaktadır (56).

ANGPTL4 yapısal olarak lipoprotein lipazın homoloğu olan pankreatik lipaz enzimini de inhibe eder. Pankreatik lipaz gastrointestinal kanalda diyetle alınan triaçilgliserollerini hidroliz eden başlıca enzimdir. ANGPTL4 eksik farelerde normal farelere göre artmış lipid emilimi görülür. Bu da daha yüksek vücut ağırlığı ve yağ kütlesine neden olmaktadır (57).

ANGPTL-4'ün hücredeki temel fonksiyonu hücreyi aşırı yağlanmadan korumak, lipotoksisteyi ve endoplazmik retikulum (ER) stresini engellemektir (58). ANGPTL-4'ün inflamasyon üzerinde de etkileri mevcuttur. Makrofajdaki lipoprotein lipazı inhibe ederek yağ asitlerinin salınımını, köpük hücre oluşumunu, ER stresini ve inflamatuvar yanıtın başlamasını engellemektedir (59).

C-terminal formunun anjiogenez üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Endotel hücreler üzerinde etki göstererek hücre proliferasyonunu, migrasyonunu, tübül oluşumunu ve neovaskülarizasyonu inhibe etmektedir. Bu etkisini endotel hücrelerinde Raf/MEK/ERK 1/2 MAP kinaz yolağını inhibe ederek göstermektedir. C-terminal formunun glikozilasyonu anti-anjiogenik aktivitesi için kritik önem taşımaktadır. Tam uzunluktaki formda ise N-terminal formunda bulunan E40K (rs116843064) varyantı C-terminal bölgesinin anjiogenik özelliklerini etkilemektedir. E40K varyantındaki fonksiyon kaybına yol açan bir mutasyonun Raf/MEK/ERK1/2 MAP kinaz yolağının supresyonunu azaltarak anjiogenezi indüklediği gösterilmiştir (60).

Hipoksiye yanıt olarak ANGPTL-4 subendotelial ekstraselüler matrikste toplanmaktadır. Ekstraselüler matriks ile sadece tam uzunluktaki ANGPTL-4'ün

etkileştiği bilinmektedir. Bu etkileşim N'ye bağlı glikan zincirler ile heparin/heparan sülfat proteoglikan ile olmaktadır. C-terminal formu glikozile olmadığında bu etkileşim de olmamaktadır (61).

2.3.2. ANGPTL-4 ve Lipid Metabolizmasına Etkileri

Yapılan çok merkezli yapılan bir çalışmada Tip 2 DM hastalarının %67.1'inde dislipidemi saptanmıştır (62). Lipoprotein lipaz enzimi dolaşımdaki lipoproteinlerin içindeki trigliseridi hidrolize ederek trigliserid seviyelerini düzenlemektedir. İnsülin lipoprotein lipazın ekspresyonu ve aktivitesini etkilemektedir (63, 64).

ANGPTL-4'ün lipoprotein lipazı inhibe etmesi için oligomerize olması gerekmektedir. Oligomerizasyon kaybı N-terminal bölgesinin stabilitesini azaltır ve plazma trigliserid seviyelerindeki artışın azalmasına yol açar. İntermoleküler disülfid bağları ANGPTL-4'ün hiperlipidemik etkisinin büyüklüğünü belirler (65). ANGPTL-4'ün lipoprotein lipazı inhibe etmesi GPIHBP1 (Glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein) tarafından engellenmektedir (66). Lipoprotein lipazın endotel hücre yüzeyine bağlanması heparin sülfat proteoglikanlar ile gerçekleştiği bilinmekteydi. Son yapılan çalışmalarda GPIHBP1'in lipoprotein lipazın alternatif bir bağlayıcısı olduğu gösterilmiştir (67, 68).

Sukonina ve arkadaşları ANGPTL-4 ekspresyonu ve lipoprotein lipaz aktivitesi arasında ters bir ilişkinin olduğunu göstermişlerdir (55). Nilsson ve arkadaşları ise dolaşımda bulunan ANGPTL-4'ün dokulardaki ANGPTL-4'e göre lipoprotein lipaz aktivitesine daha az etkisinin olduğunu göstermişlerdir (69).

Adenovirüs aracılığı ile ANGPTL-4 ekspresyonu arttırıldığında virüs enjeksiyonundan birkaç gün sonra plazma trigliserid seviyelerinin oldukça yükseldiği saptanmıştır (65). Farelerde yapılan bir çalışma ile bu etki doğrulanmıştır. Rekombinan ANGPTL-4 proteininin intravenöz enjeksiyonundan sonra plazma trigliserid düzeyleri yükselmektedir (70). ANGPTL-4 geninin inaktivasyonunun ise düşük plazma trigliserid düzeyleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (71-73). Fareler ve maymunlar üzerinde yapılan bir çalışmada ANGPTL-4'e karşı insan monoklonal

antikorunun lipid seviyeleri üzerindeki etkisi test edilmiştir. ANGPTL-4'ün monoklonal antikor ile inhibisyonu trigliserid seviyelerinde azalmaya yol açmıştır (74).

ANGPTL-4 düzeylerinin metabolik sendromu olan hastalarda plazma trigliserid düzeyleri ile pozitif ilişkili olduğu gösterilmiştir (75). Başka bir çalışmada ANGPTL-4 düzeylerinin yaş ve vücut yağ kütlesi ile pozitif ilişkisi, HDL-kolesterol ile negatif ilişkisi saptanmıştır ancak trigliserid düzeyleri ile ilişkisi saptanmamıştır (67).

ANGPTL-4 geninde fonksiyon kaybına yol açan bazı varyantlar düşük trigliserid düzeyleri ile ilişkilidir (12). E40K varyantının düşük trigliserid ve yüksek HDL-kolesterol seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu varyantta bulunan lizin alleli hücreden sekrete edildikten sonra ANGPTL4'ün destabilizasyonuna neden olmaktadır. Bu durum ANGPTL-4'ün oligomer formuna girmesini önler. Bu yüzden E40K varyantı lipoprotein lipazın enzimatik aktivitesinde artışa yol açar (71, 76). T266M (rs1044250) varyantı E40K'dan daha yaygın görülmektedir ve trigliserid seviyelerine daha az etkisi olduğu gösterilmiştir (77).

Bu sonuçlar ANGPTL-4'ün lipid metabolizma bozuklukları ile ilişkisinin olabileceğini ve hipertrigliseridemi tedavisinde farmakolojik bir hedef olabileceğini göstermektedir.

2.3.3. ANGPTL-4 ve Glukoz Metabolizmasına Etkileri

Lipid metabolizmasında olduğu gibi ANGPTL-4'ün glukoz metabolizması üzerinde de önemli etkileri mevcuttur. Ge ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada adenovirüs aracılığı ile farelerde ANGPTL-4'ün ekspresyonu arttırıldığında plazma glukoz düzeylerinde dramatik bir azalma saptanmıştır (65). Xu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise diyabetik olmayan farelerde ANGPTL-4 ekspresyonu arttırıldığında kan glukoz seviyelerinin azaldığı ve glukoz toleransının arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada diyabetik farelerde ANGPTL-4 tedavisinin

hiperglisemiye azalttığı ve glukoz intoleransı ve hiperinsülinemiye düzelttiği görülmüştür. Diyabetik farelerin PPAR agonistleri ile tedavisinin de benzer glukoz düşürücü ve insülin sensitivitesini arttırıcı etki yaptığı gösterilmiştir. Bu da diabetes mellitus tedavisinde yaygın olarak kullanılan PPAR agonistlerinin glukoz düşürücü etkisinin ANGPTL-4 üretiminin uyarılması ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. ANGPTL-4 hepatic glukoz üretimini inhibe ederek glukoz düşürücü etki göstermektedir. Bu etki fare hepatositlerinde gösterilmiştir (78-80). ANGPTL-4 geninin delesyonunun veya karaciğerde ekspresyon artışının ise açlık ve tokluk plazma glukoz seviyelerini etkilemediği gösterilmiştir (81).

İnsülinin lipoprotein lipazın önemli bir düzenleyicisi olduğu bilinmektedir (82). Lipoprotein lipazın insülin tarafından regülasyonunun mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Farklı insülin sensitiviteyi olan diyabetik olan ve olmayan bireylerde yapılan bir çalışmada insülin infüzyonunun plazma ANGPTL-4 seviyesini azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuç insülinin lipoprotein lipazın aktivitesini ANGPTL-4 aracılığı ile değiştirebileceğini düşündürmektedir (83, 84).

Tip 2 DM tanısı olan 46 hastanın dahil edildiği bir çalışmada ANGPTL-4 düzeyleri tip 2 DM tanısı olan hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Bu çalışmada serum ANGPTL-4 düzeyleri plazma glukoz konsantrasyonu ve insülin direnci ile ters orantılı olarak bulunmuştur. Azalmış ANGPTL-4 düzeylerinin diabetes mellitusa neden olan bir faktör olabileceği düşünülmüştür (78). Buna karşın 40 Tip 2 DM ve obezite tanısı olan, 23 Tip 2 DM tanısı olmayıp obezite tanısı olan, 22 anoreksiya nervoza tanısı olan, 72 saatlik açlığa tabi tutulan 15 birey ve kısa bağırsak sendromu tanısı olan 12 hastanın dahil edildiği bir çalışmada ANGPTL-4 düzeyleri obez hastalarda daha yüksek, anoreksiya nervoza hastalarında daha düşük bulunmuştur. ANGPTL-4 seviyelerinin VKİ, kan glukozu, HbA1c, trigliserid, insülin, leptin, hsCRP (high sensitivity C-reactive protein) ve HOMA (Homeostatic model assessment) indeks ile pozitif ilişkili, HDL-kolesterol ile negatif ilişkili olduğu gösterilmiştir. VKİ ve HbA1c serum ANGPTL-4 seviyesinin bağımsız prediktörleri olarak bulunmuştur (85).

Tip 2 DM tanısı olmayan bozulmuş glukoz toleransı olan obez hastalarda da ANGPTL-4 seviyeleri anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. ANGPTL-4'ün VKİ, bel çevresi, yağ kütlesi, HbA1c, HOMA-IR, trigliserid ve inflamatuvar markerlar ile pozitif ilişkili olduğu gösterilmiştir. Obezitesi olan 51 hastaya hipokalorik diyet verilmiş ve 2 yıl takip edilmiş. Takip sonunda kilo alanlarda VKİ, yağ kütlesi, açlık glukozdaki artış ile paralel olarak ANGPTL-4 seviyelerinde artış, kilo verenlerde ise bu parametrelerde azalma olduğu gösterilmiştir (86). ANGPTL-4 geninin inaktivasyonunun glukoz homeostazında iyileşme ve Tip 2 DM riskinde azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (87).

ANGPTL-4 glukoz metabolizmasında önemli rol oynamaktadır ve Tip 2 DM tanılı hastalarda düzeyi değişmektedir. Bu da ANGPTL4'ün diabetes mellitus gelişimi ve etyopatogenezi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

2.3.4. ANGPTL-4 ve Diyabet Komplikasyonları ile İlişkisi

ANGPTL-4 ve diyabetik retinal inflamasyon ilişkisini araştıran bir çalışmada ANGPTL-4 düzeyleri diyabetik farelerde ve yüksek glukozla maruz bırakılmış insan retinal mikrovasküler endotel hücrelerinde yüksek olarak bulunmuştur. ANGPTL-4 profilin-1 sinyal yolağının aktivasyonu ile artmış inflamasyon, permeabilite ve anjiogenezin potent bir düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar ANGPTL4 upregülasyonunun yüksek glukoz ile indüklendiğini, HIF1 (Hypoxia inducible factor-1) alfa aktivasyonundan bağımsız olduğunu göstermiştir. ANGPTL-4'ün proliferatif diyabetik retinopati tedavisinde yeni bir hedef olabileceği belirtilmiştir (88).

Xue ve arkadaşlarının yaptığı diyabetik nefropatili fare modeli çalışmasında benazepril hidrokloridin ANGPTL-4 ekspresyonunu azaltarak diyabetik nefropatide düzelme sağladığı ve proteinüriyi azalttığı bulunmuştur (89). Clement ve arkadaşlarının yaptığı bir fare modeli çalışmasında ise ANGPTL-4 ekspresyon artışının nefrotik düzeyde proteinüriyi indüklediği ve artırdığı, ANGPTL-4 knock-in farelerde ise proteinürinin daha düşük olduğu gösterilmiştir (90).

Transgenik diyabetik fareler ile yapılan bir çalışmada diyabetik ülser yarası üzerine ANGPTL-4'ün rekombinan C-terminal formu topikal şekli uygulanmıştır. Bu uygulama sonucunda yara bölgesinde angiogenezin artarak yara reepitelizasyonunun hızlandığı gösterilmiştir (30).

ANGPTL-4 seviyelerinin ve rs4076317, rs2278236, rs1044250 varyantlarının diğer kardiyovasküler risk faktörlerinden bağımsız olarak gelecekteki kardiyovasküler olayları öngördüğü gösterilmiştir. ANGPTL-4 rs1044250 polimorfizmi TT genotipinin koroner arter hastalığı olanlarda koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (14). Hipertansiyon ve ANGPTL-4 düzeyleri arasında ilişkiyi araştırmayı amaçlayan bir çalışmada ANGPTL-4 düzeyleri hipertansif hastalarda daha yüksek bulunmuştur. Çalışmaya 69 hipertansif ve 50 hipertansif olmayan birey dahil edilmiştir. Aynı zamanda hipertansiyonu olan Tip 2 DM hastalarında hipertansiyonu olmayan Tip 2 DM hastalarına göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (91).

Literatürde ANGPTL-4 ve diyabetik komplikasyonların ilişkisinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma mevcut olduğu görüldü. Mevcut çalışmalardaki sonuçlara bakıldığında ANGPTL-4'ün diabetes mellitusun mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları ile daha fazla ilişkisinin olduğu öngörülebilir.

2.3.5. ANGPTL-4 Tek Nükleotid Polimorfizm Çalışmaları

ANGPTL-4'ün en bilinen tek nükleotid polimorfizmleri rs1044250 (T266M) ve rs116843064 (E40K)'tür. E40K varyantı lipoprotein lipaz enziminin aktivitesinde artışa yol açmaktadır. E40K varyantında bulunan lizin alleli ANGPTL-4'ün hücreden sekrete edildikten sonra destabilizasyonuna neden olmakta ve oligomer formuna girmesini önlemektedir. Bu durum lipoprotein lipaz enzim aktivitesinde artışa ve trigliserid seviyelerinde azalışa neden olmaktadır. Bu varyant Avrupa kökenli Amerikalıların %1.3'ünde bulunmaktadır (71, 76, 77). Gusarova ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bu varyantı taşıyanlarda Tip 2 DM olasılığının ve açlık glukozlarının düşük, insülin sensitivitesinin ise yüksek olduğu bulunmuştur (87).

ANGPTL-4 genindeki varyantların trigliserid düzeylerine farklı etkileri mevcut olduğundan kardiyovasküler risk üzerinde de farklı etkileri olabilir. ANGPTL-4 inaktive edici varyantları koroner arter hastalık riskinde azalma ile ilişkili bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda inaktive edici bir varyant olan E40K taşıyanlarda koroner arter hastalığına yakalanma riski daha düşük bulunmuştur (74, 92).

ANGPTL-4'ün E40K varyantının incelendiği başka bir çalışmada GA genotipinin daha düşük metabolik sendrom riski ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. A alleli olanlarda metabolik sendrom riski 6.7 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. ANGPTL-4 genotipleri arasında lipid profil düzeyleri arasında belirgin farklılık vardır. GA genotipini taşıyanlarda GG homozigot genotipine oranla HDL-kolesterol seviyesinin daha yüksek trigliserid düzeyinin daha düşük olduğu gösterilmiştir (11).

Bu çalışmalar sonucunda E40K varyantının düşük trigliserid ve yüksek HDL-kolesterol seviyesi ile ilişkili olduğu, glukoz metabolizması üzerinde olumlu etkilerinin olduğu ve bu varyantı taşıyanlarda kardiyovasküler hastalık riskinin daha düşük olduğu söylenebilir.

T266M varyantı ANGPTL-4'ün C-terminal bölgesinde bulunmaktadır. Endotel hücrelerinde anjiogenezi ve vasküler permeabiliteyi artırmakta ve ANGPTL-4 aktivitesini azaltmaktadır. Anjiogenez ile ilişkili olduğu için kardiyovasküler riski etkileyebileceği düşünülmektedir. Trigliserid seviyesine etkisinin ise E40K varyantına göre daha az olduğu gösterilmiştir (13).

Yapılan bir meta-analizde ANGPTL-4 seviyeleri, ANGPTL-4 varyantları ve kardiyovasküler hastalık riskinin ilişkisine bakılmıştır. Bu çalışmalarda toplam 5 çalışmadan 4061 vaka ve 15395 kontrol olduğu görüldü. Çalışma sonucunda ANGPTL-4 düzeylerinin yaş ve vücut yağ kütlesi ile pozitif ilişkisinin olduğu bulunmuştur. HDL-kolesterol ile negatif ilişkisi saptanmıştır. Trigliserid seviyeleri ile ilişkisi gösterilememiştir. T266M varyantı ile kardiyovasküler hastalık riski arasında ilişki saptanmamıştır (67).

İskemik inme hastalarında yapılan rs4076317 ve rs1044250 tek nükleotid polimorfizmlerinin değerlendirildiği bir çalışmada, iskemik inme geçiren hastalarda rs4076317 tek nükleotid polimorfizmi GG varyantı görülme oranı %7, kontrol grubunda ise %10.9 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (93).

Yapılan başka bir çalışmada ANGPTL-4 seviyeleri metabolik sendromu olan hastalarda olmayanlara göre daha fazla bulunmuştur. ANGPTL-4 rs4076317, rs2278236 tek nükleotid polimorfizmlerinin gelecekteki kardiyovasküler olaylardan koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (sırasıyla adjusted HR: 0.70 [0.54-0.90]; p = 0.005, 0.76 [0.61-0.94]; p = 0.012). ANGPTL-4 rs1044250 tek nükleotid polimorfizmini taşıyan hastaların ise kardiyovasküler olaylar için artmış risk taşıdıkları belirtilmiştir (adjusted HR: 1.30 [1.03-1.62]; p = 0.025) (14).

Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada rs2967605 CC/TT genotipinin azalmış koroner arter hastalığı ve iskemik inme ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada rs4076317 tek nükleotid polimorfizmi CG/CC genotipi olanlarda GG genotipi olanlara göre daha yüksek total kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyleri saptanmıştır. CG/GG genotipi olanlarda CC genotipi olanlara göre atorvastatin tedavisinden sonra daha düşük total ve LDL-kolesterol seviyeleri olduğu gösterilmiştir (12).

ANGPTL-4 rs4076317 tek nükleotid polimorfizmi GG genotipini taşıyanlarda vücut yağ oranı 26.2 ± 1.3 , bel çevresi/kalça oranı 0.89 ± 0.09 olarak CC/CG olanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Vücut yağ oranı ve bel çevresi/kalça oranı açısından GG, CC ve CG genotipleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (sırasıyla p = 0.02, p = 0.002) (94).

ANGPTL4'nin en sık görülen E40K ve T266M varyantları dışındaki çeşitli tek nükleotid polimorfizmlerinin serum lipid profili, metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalıklar ve serebrovasküler hastalıklar üzerine etkileri olduğunu göstermektedir. Literatürde ANGPTL-4 geninde olan tek nükleotid polimorfizmleri ile diyabetik ayak ve diyabet komplikasyonlarının ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

2.4. Follistatin Benzeri 1 (FSTL1) Protein

Follistatin benzeri 1 (FSTL1) protein fare osteoblastik hücre dizilerinden klonlanan TSC-36 (TGF- β 1- stimulated clone 36) ve fare glioma hücrelerinden üretilen FRP (follistatin-related protein) olarak da adlandırılan iki farklı araştırma grubu tarafından bulunan bir glikoproteindir (95, 96).

FSTL1 geni FSTL1 proteinini ve miR-198'i kodlamaktadır (29). FSTL1 proteini 308 aminoasitten meydana gelir. Ekstraselüler kalsiyum bağlayan bölge, follistatin benzeri bölge, Kazal-benzeri bölge ve Von Willebrand faktör tip C (vWFC) bölgesine ve 20 aminoasitlik N-terminal sinyal peptidine sahiptir. Aynı fonksiyonel aktiviteye sahip iki farklı glikozile izoform şeklinde bulunur. FSTL1'in follistatin benzeri bölgesi dışındaki bölgelerinin işlevleri henüz aydınlatılamamıştır. Bu durum FSTL1'in farklı fonksiyonel özelliklere sahip olabileceğini düşündürmektedir (97).

FSTL1 akciğer, kalp, beyin ve üriner sistem gibi birçok dokuda ekspresyone edilmektedir (28). FSTL1 mRNA düzeyleri erişkin farede en yüksek kalp, akciğer ve subkutan beyaz adipoz dokuda saptanmıştır (98). FSTL1'in hücre proliferasyonu, apoptozu, diferansiyonu ve migrasyonunun düzenlenmesi ve immün yanıtın düzenlenmesinde etkisi vardır (28). FSTL1 ekspresyonu kardiyovasküler hastalıklar, sistemik otoimmün hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalıkta değişmektedir.

FSTL1'in inflamasyonda önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir. İnflamatuar süreçlerde FSTL1'in rolü ile ilgili yapılan çalışmalarda hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar etkileri olduğu saptanmıştır (99). Miyamae ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada FSTL1'in adenovirus aracılığı ile makrofaj ve fibroblastlara transfeksiyonu sonucu proinflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-6) salınımlarında artış olduğu görülmüştür (100).

FSTL1'in romatoid artritli hastaların sinovyal dokularında ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (101). FSTL1'in serum seviyelerinin romatoid artrit, ülseratif kolit, sistemik lupus eritematozus, Sjögren sendromu, sistemik skleroz, polimiyozit,

dermatomiyozit gibi sistemik inflamatuvar hastalıklarda arttığı görülmüştür (102).

FSTL1'in proinflamatuvar etkisinin TLR4 (toll-like receptor 4) sinyalini aktive etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (103). TLR4 gram negatif bakterilerdeki lipopolisakkaridi ve viral komponentleri tanıyan ve doğal immüniteyi harekete geçiren bir proteindir (104). Ayrıca vücuttaki endojen molekülleri de tanıyarak obezite ile tip 2 DM gibi kronik hastalıklardaki inflamasyonu uyarıcı etkisi bulunmaktadır (105). İnsülin direncinin gelişiminde kronik inflamasyon önemli bir rol oynamaktadır (106). FSTL1'in adipositlerde insülin sinyalini bozduğu saptanmıştır. Bu etkisini insülin uyarısına yanıt olarak adipositlerde Akt ve IRS-1 (Insulin receptor substrate-1) fosforilasyonunu azaltarak göstermektedir. FSTL1'in insülin sinyali üzerindeki etkisine uyardığı proinflamatuvar sitokinler de katkıda bulunmaktadır (28).

FSTL1 geni tarafından kodlanan FSTL1 proteini yara iyileşme sürecinde promigratuvar, miR-198 ise antimigratuvar etki göstermektedir. Sağlıklı epidermiste miR-198 ekspresyonu fazladır, FSTL1 ekspresyonu ise oldukça düşüktür. Epidermiste hasar olduğu zaman miR-198 ekspresyonu azalmakta ve FSTL1 ekspresyonu artmaktadır. En az 24 saat miR-198 ekspresyonu düşük kalmaktadır. Hasardan 24 saat sonra epidermal keratinositlerde miR-198 ekspresyonunun olmadığı gösterilmiştir. MiRNA-198'in aksine hasardan 24 saat sonra epidermal keratinositlerde FSTL1 ekspresyonunun olduğu görülmüştür. Kronik diyabetik ayak ülserlerinde FSTL1 ekspresyonunda bozulma, miR-198 ekspresyon kaybı olduğu gösterilmiştir. Bu durumda keratinosit migrasyonu ve reepitelizasyon olumsuz yönde etkilenmektedir (29).

Son yıllarda FSTL1'in kardiyoprotektif etkisi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu etkisinin mekanizması ile ilgili bilgiler ise sınırlıdır. Kalpteki basınç yükünün artması ve iskemi/reperfüzyon hasarı FSTL1 ekspresyonunu artırmaktadır. Kardiyak myositlerde FSTL1'in ekspresyonunda artış Akt ve ERK1/2 sinyal yollarını uyarır. Bu yolların uyarılması ile kardiyak myositler hipoksi ile ilişkili apoptozdan korunmuş olur. Tam tersine FSTL1 ekspresyonunda kayıp Akt fosforilasyonunu azaltır ve stres ilişkili apoptoz artar (107). FSTL1 ayrıca miyokardı

iskemi/reperfüzyon hasarından AMP ile aktive olan protein kinazları uyararak korumaktadır. AMP ile aktive olan protein kinazlar apoptozu ve inflamasyonu baskılamaktadır (108).

FSTL1'in proangiogenik özellikleri de vardır. FSTL1 dokuların iskemiye maruz kalmalarına yanıt olarak sınıır ve endotel hücrelerinin migrasyonunu ve diferansiyasyonunu artırır. Bunu PI3K (fosfatidilinozitol-3 kinaz), AKT ve eNOS (endotelial nitrik oksit sentaz) enzimlerini aktive ederek yapmaktadır (109).

FSTL1 seviyelerinin kalp yetmezliği, akut koroner sendrom ve kronik obstrüktif akciğer hastalığına bağlı pulmoner hipertansiyonda arttığı gösterilmiştir (110-113). Widera ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada akut koroner sendrom hastalarında yüksek serum FSTL1 düzeyleri ile mortalite riski arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (112). FSTL1 miyokard infarktüsünde kardiyak fibroblastlardan salınarak kalp dokusunun akut dönemde onarımında görev almaktadır (114).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi ve Amacı

Bu araştırma, diyabetik ayak tanısı almış Tip 2 DM'li hastalarda ANGPTL-4, FSTL1 düzeyleri ve ANGPTL-4 tek nükleotid polimorfizmlerinin (rs1044250 ve rs4076317) diyabetik ayak ve diyabet komplikasyonlarının ilişkisini incelemeyi hedefleyen vaka-kontrol çalışmasıdır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalı'nda yapıldı. Araştırma Nisan 2018 - Ağustos 2019 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmanın evrenini, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları polikliniğine başvuran veya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları servislerinde yatan diyabetik ayak tanısı ile izlenen 60 Tip 2 diabetes mellituslu hasta (Grup 1), diyabetik ayak sorunu olmayan 70 Tip 2 diabetes mellituslu hasta (Grup 2) ve 53 sağlıklı birey kontrol grubu (Grup 3) oluşturdu.

Çalışmanın kontrol grubu, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları polikliniğine başvuran 18 yaşından büyük, diabetes mellitus tanısı ve kronik hastalığı olmayan bireylerden oluşturuldu.

Araştırmaya dahil edilme kriterleri:

Hasta Grubu:

- Tip 2 DM tanısı olması
- Hastanın 18 yaşından büyük olması
- Hastanın çalışmaya katılmayı kabul etmesi ve “Bilgilendirilmiş Onam Formu”nu okuyup imzalaması

Sağlıklı Kontrol Grubu:

- Diabetes mellitus tanısı olmaması
- Bireyin 18 yaşından büyük olması
- Kronik hastalığı olmaması
- Hastanın çalışmaya katılmayı kabul etmesi ve “Bilgilendirilmiş Onam Formu”nu okuyup imzalaması

Araştırmadan dışlanma kriterleri:

- Gebelik ve postpartum dönemdeki hastalar
- Kronik karaciğer hastalığı olanlar
- Tedavi altındaki kanser hastaları
- Diyabetik ayak ülseri dışında aktif enfeksiyon hastalığı olanlar
- Akut veya kronik inflamatuvar hastalığı olanlar
- Alkol ve madde bağımlılığı olanlar

3.4. Kullanılan Gereçler

Çalışmaya dahil edilen hastaların Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalında anamnezleri alındı ve fizik muayeneleri yapıldı. Hastaların yaş, cinsiyet, medeni durum gibi demografik özellikleri ve diabetes mellitus tanı yaşı, kadın hastalarda gestasyonel diabetes mellitus öyküsü, diyabet süresi, akut komplikasyon varlığı, akut komplikasyon tipi, diyabetik diyet uyumu ve egzersiz yapıp yapmadığı ile ilgili bilgiler kaydedildi.

Mevcut olan diğer hastalıkları, daha önce kullanmış ve halen kullanmakta olduğu tedaviler, sigara ve tütün kullanım durumları, oral antidiyabetik tedavi ve

insülin kullanım süreleri kaydedildi. Diyabetik komplikasyonlar ile ilgili ayrıntılı sorgulama yapıldı.

Hastaların boy, vücut ağırlığı, vücut kütle indeksi, bel çevresi gibi antropometrik ölçümleri kaydedildi. Vücut kütle indeksi bireylerin vücut ağırlıklarının (kg olarak), boy uzunluklarının (metre cinsinden) karesine bölünmesiyle hesaplandı.

Hastaların fizik muayene bulguları, sistolik ve diyastolik kan basınçları kaydedildi. Diyabetik ayak ülserleri ile ilgili detaylı tanımlama yapıldı. Hipertansiyon sistolik kan basıncının 140 mmHg, diyastolik kan basıncının 90 mmHg üzerinde olması olarak tanımlandı (115). Hipertansiyon tanısı ile takipli ve antihipertansif tedavi altında olan hastalar hipertansif olarak kabul edildi. Hastaların kan basınçları istirahat halinde, oturur pozisyonda, en az 10 dakika dinlendikten sonra, sırtı arkadan desteklenerek hastanın kol çevresi ile uyumlu manşon kullanılarak aneroid manometre ile ölçüldü. Ölçüm öncesindeki 30 dakikalık süre içinde hastanın egzersiz yapmadığına, sigara, çay veya kahve içmediği ve yemek yemediğine dikkat edildi.

Tip 2 DM tanısı Amerikan Diyabet Cemiyeti kriterlerine göre koyuldu (154). Diyabetik retinopatiye ait veriler hastaların dosyalarındaki oftalmolojik muayene notlarından elde edildi. Diyabetik retinopati background ve proliferatif retinopati olarak sınıflandırıldı.

Periferik duyuşal nöropati değerlendirmesi için pinprick testi, motor ve refleks muayenesi ve 10 gr monofilaman ile duyu muayenesi yapıldı. Kranial sinir tutulumu, otonom nöropati, erkek hastalarda erektil disfonksiyon olup olmadığına dair veriler kaydedildi. Nöropatinin diabetes mellitus dışındaki nedenleri dışlandı.

Mikroalbuminüri idrar albümin/kreatinin oranının 30-300 mg/gr arasında olması, makroalbuminüri idrar albümin/kreatinin oranının 300 mg/gr üstünde ve proteinüri idrar protein/kreatinin oranının 150 mg/gr üstünde olması olarak tanımlandı. Ateş, yoğun egzersiz gibi proteinüride yalancı pozitiflik yapan durumlar dışlandı. Diyabetik nefropati en az 3 ay aralıkla eGFR \leq 60 ml/dk veya albumin/kreatinin

oranının yüksek olması olarak tanımlandı. Her katılımcı için estimated GFR (eGFR) hesaplandı. Estimated GFR formülü şu şekildedir: $186 \times (\text{Kreatinin}/88.4)^{-1.154} \times (\text{Yaş})^{-0.203} \times (\text{kadınsa } 0.742) \times (\text{siyahi ırktansa } 1.210)$.

Koroner arter hastalığı, miyokard enfarktüsü, hipertansiyon tanıları, koroner arter bypass greftlemesi ve serebrovasküler olay öyküleri olup olmadığı kaydedildi. Hastaların kardiyovasküler risk faktörleri değerlendirildi. Kardiyolojik muayene ve elektrokardiyografi gibi tetkik sonuçları değerlendirildi.

Periferik arter hastalığı tanısı için arterial doppler ultrasonografi tetkiki kullanıldı. Femoral, süperfisyal, popliteal, posterior tibial arter ve anterior tibial arterlerdeki aterosklerotik değişiklikler, obstrüksiyon ve stenoz değerlendirildi. Anlamli stenozu olan hastalar kaydedildi. Anlamli stenoza ait veriler hastaların doppler USG raporlarından elde edildi. Hastaların serebrovasküler olay öyküsü olup olmadığına dair veriler kaydedildi. Makrovasküler hastalık; koroner arter hastalığı, serebrovasküler olay veya periferik arter hastalığının olması olarak tanımlandı.

Diyabetik ayak tanısı olan Tip 2 diyabetik hastaların önceki amputasyon öyküleri, amputasyon sayıları, debridman, flep ile rekonstrüksiyon ve VAC (Vacuum assisted closure - vakum destekli kapama) tedavileri yapıp yapılmadığına dair veriler toplandı. Alt ekstremitte arterial doppler USG, alt ekstremitte BT anjiyografi, ayak MR, kemik sintigrafisi raporları ayrıntılı olarak kaydedildi. Ayak MR ve kemik sintigrafisi sonuçlarına göre osteomyelit olup olmadığı ve oral veya intravenöz antibiyotik kullanımları kaydedildi. Diyabetik ayak ülserlerinin derecelendirmesi Wagner evrelemesine göre yapıldı (116). Wagner evrelemesi tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. Wagner Evrelemesi

Evre	Lezyon Tanımı
0	Açık lezyon yok, deformite veya selülit mevcut.
1	Yüzeyel ülser mevcut.
2	Ülser ligaman, tendon, eklem kapsülü veya derin fasyaya ulaşmış, abse veya osteomyelit yok.
3	Derin ülser, apse veya osteomyelit var
4	Ayakta lokalize gangren mevcut
5	Tüm ayakta gangren mevcut

Hastalardan açlık kan şekeri, HbA1c, total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid, BUN, kreatinin, ANGPTL-4 ve FSTL1 tetkikleri için en az 8 saat açlık sonrası sabah aç iken kan örnekleri alındı. Hastalardan proteinüri ve albuminüri değerlerine bakılması için idrar tetkiki istendi.

Hastaların kan ve idrar tetkiki analizleri için Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarının teknik alt yapısı kullanıldı. Açlık kan şekeri, total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid, BUN, kreatinin Beckman Coulter AU5800 cihazında Beckman kitleri ile ölçüldü (Beckman Coulter). HbA1c kromatografik yöntem HPLC ile (Bio-rad) analiz edildi. ANGPTL-4 ve FSTL1 tetkikleri çalışılana kadar örnekler -80°C’de saklandı. Serum ANGPTL-4 ve FSTL1 düzeylerinin tayini sırasıyla Human ANGPTL-4 PicoKine ELISA Kit EK0960, FSTL1 PicoKine ELISA Kit EK0965 kitleri kullanılarak ELISA yöntemi ile yapıldı.

ANGPTL-4 gen polimorfizm analizi için EDTA’lı tüplere 5-10 cc periferik venöz kan örneği alındı. Analize kadar örnekler -80°C’de saklandı. ANGPTL-4 gen polimorfizm analizi Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarlarının teknik alt yapısı kullanılarak yapıldı.

ANGPTL-4 ve FSTL1 tetkiklerinin çalışılabilmesi için gerekli kitlerin ve ANGPTL-4 gen polimorfizm analizi için gerekli malzemelerin temini için Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne başvuruldu. Projemiz 13.05.2019 tarihinde komisyon tarafından kabul edildi (Proje Kodu: THD-2019-18048).

3.4.1. Visseral Adipozite İndeksi

Visseral adipozite indeksi basit antropometrik ve metabolik parametrelerden oluşan, genel popülasyonda kardiyometabolik risk ile bağımsız ilişkili olan, adipoz doku fonksiyonunu ve dağılımını gösteren bir belirteçtir. Kardiyometabolik risk durumunun aşikar bir metabolik sendroma dönüşmeden önce erken tanınmasında bir araç olarak kullanılabilir (117). VAI katılımcıların antropometrik ölçümleri ve lipid profil değerleri kullanılarak hesaplandı. VAI hesaplama formülü şu şekildedir:

$$\text{Erkek: VAI} = [\text{Bel çevresi}/39.68 + (1.88 \times \text{VKİ})] \times (\text{Trigliserid}/1.03) \times (1.31/\text{HDL-kolesterol})$$

$$\text{Kadın: VAI} = [\text{Bel çevresi}/36.58 + (1.89 \times \text{VKİ})] \times (\text{Trigliserid}/0.81) \times (1.52/\text{HDL-kolesterol})$$

Katılımcılar visseral adipozite indekslerine göre adipoz doku disfonksiyonu (ADD) açısından yok, hafif, orta ve ciddi olarak sınıflandırıldı (118).

Tablo 2. Adipoz Doku Disfonksiyonunun (ADD) Yaşa Göre Sınıflandırılması

Yaş (yıl)	ADD yok	Hafif ADD	Orta ADD	Ciddi ADD
< 30	≤ 2.52	2.53 - 2.58	2.59 - 2.73	> 2.73
≥ 30 < 42	≤ 2.23	2.24 - 2.53	2.54 - 3.12	> 3.12
≥ 42 < 52	≤ 1.92	1.93 - 2.16	2.17 - 2.77	> 2.77
≥ 52 < 66	≤ 1.93	1.94 - 2.32	2.32 - 3.25	> 3.25
≥ 66	≤ 2	2.01 - 2.41	2.42 - 3.17	> 3.17

3.4.2. Framingham Risk Skoru

Hastalar ve sağlıklı kontrollerin kardiyovasküler risk açısından değerlendirmeleri; cinsiyet, yaş, sistolik kan basıncı, total kolesterol, HDL-kolesterol, antihipertansif kullanımı, sigara kullanımı ve diabetes mellitus varlığı parametrelerinden oluşan Framingham Risk Skoru (2008) kullanılarak yapıldı (119).

3.4.3. ANGPTL-4 Gen Polimorfizm Analizi

3.4.3.1 Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu ve DNA Kalite Analizi

Araştırmaya katılacak hastalardan onam alınarak EDTA'lı tüplere 5-10 cc periferik venöz kan alındı. DNA izolasyonu amonyum asetat tuzuyla çöktürme yöntemiyle yapıldı. Genomik DNA konsantrasyonunun ve saflığının ölçümü için Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan bulunan NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrofotometre cihazı kullanıldı. DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerlerden belirlenmektedir. DNA'nın temizliği için A260/280 ve A260/230 değerlerine bakılmaktadır. Çünkü DNA 260, protein 280 ve karbonhidratlar da 230 nm dalga boylarında pik (en yüksek değer) yapmaktadır. Temiz bir DNA' da A260/280 oranı 1,8 ile 2,0 arasında ve A260/230 oranı ise 2'den büyük olmalıdır. Bu ölçümle 1,8'in altında elde edilen A260/280 değeri protein kontaminasyonunu, 2'nin üzerinde elde edilen A260/280 değeri de RNA kontaminasyonunu işaret etmektedir.

3.4.3.2 Sanger Yöntemi ile ANGPTL-4 Geni DNA Dizi Analizi

ANGPTL-4 geninde literatürde önceden tanımlanmış bulunan 2 tek nükleotid polimorfizmi (rs4076317, rs1044250) içeren bölgeler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR; polymerase chain reaction) yöntemi kullanılarak çoğaltıldı. Amplifikasyon için literatürde daha önce kullanılmış olan (X-W. He ve ark., 2015) primer çiftleri kullanıldı. PCR reaksiyonu için (*Thermus aquaticus*) Taq DNA polimeraz (Thermo

Fisher Scientific, MA, USA) enzimi kullanıldı. Veriti termal cyclus cihazında (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) belirlenen amplifikasyon koşulları altında PCR reaksiyonu tamamlanıp, ürünler agaroz jelde kontrol edildi. Amplifikasyonu takiben PCR ürünlerinin pürifikasyonu, Purelink PCR Purification Kitiyle (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) üretici firmanın protokolüne göre yapıldı. PCR ürünlerinin dizilenmesi için 4 µL pürifiye PCR ürünü, 4 µL distile su, 4 µL primer ve 8 µL BigDye® terminator karışımından oluşan 20 µL'lik sekans reaksiyonu hazırlanıp termal cycluslarda uygun koşullarda cycle sequencing işlemi gerçekleştirildi. PCR ürünlerinin dizileme reaksiyonu için forward ve gerekli olduğunda reverse primerler kullanıldı. Son olarak ZR® DNA Sequencing Clean-up Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) ile sekans öncesi pürifikasyon yaptıktan sonra örnekler ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kullanılarak kapiller elektroforez işlemine tabi tutuldu, Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kullanılarak istenilen polimorfizm bölgeleri genotiplendirildi.

3.5. Araştırmanın Etik Yönü

Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (Onay tarihi: 10/04/2018, karar No: GO 18/288-05). (*Ek-1: Etik Kurul Onayı*)

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, IBM, Armonk, NY, ABD) 25. versiyon kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistiklerde kategorik değişkenler için sayı ve yüzde (%) belirtilmiştir. Normal dağılım gösteren sürekli değişkenler için ortalama ve standart sapma (Standart Deviation, SD), normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenler için ortanca ve çeyrek değerler arası genişlik (Interquartile Range, IQR) belirtildi.

Kategorik değişkenlerin değerlendirilmesinde Pearson Ki-Kare testi uygulandı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğuna göre (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testi) kullanılarak incelendi. Normal dağılım gösteren değişkenler için iki bağımsız grup arasındaki istatistiksel anlamlılıklarda Student's T testi, normal dağılıma uymadığı saptanan değişkenler için Mann-Whitney U testi, üç veya daha fazla bağımsız grup arasında ANOVA veya Kruskal-Wallis testi istatistiksel yöntem olarak kullanıldı. Normal dağılım gösteren sürekli değişkenlerin birbiri ile ilişkisinin tanımlanmasında Pearson korelasyon testi kullanılmıştır.

Bağımlı değişkenlerin birbiri ile ilişkisinin değerlendirilmesinde normal dağılan değişkenler için eşleşmiş örnekler T testi, normal dağılmayan değişkenler için Wilcoxon ve McNemar testi kullanılmıştır. Tekrarlayan ölçümlerin faktörler ile ilişkisinin değerlendirilmesinde tekrarlayan ölçümler varyans analizi, bağımlı değişkenlerin faktörler ile ilişkisinin değerlendirilmesinde sürekli değişkenler için lineer regresyon, kategorik değişkenler için lojistik regresyon, tekrarlayan ölçümlerin modellenmesinde general estimated equations kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Demografik, Antropometrik Veriler ve Laboratuvar Sonuçları

Bu çalışmaya diyabetik ayak tanısı ile izlenen 60 Tip 2 diabetes mellituslu hasta (Grup 1), diyabetik ayak sorunu olmayan 70 Tip 2 diabetes mellituslu hasta (Grup 2) ve 53 sağlıklı birey kontrol grubu (Grup 3) olarak alındı.

Grup 1'deki hastaların 19'u (%31.67) kadın, 41'i (%68.33) erkek, grup 2'deki hastaların 48'i (%68.57) kadın, 22'si (%31.43) erkekti. Grup 3'teki bireylerin ise 28'i (%52.83) erkek, 25'i (%47.17) kadın olduğu görüldü. Grup 1'de yaş ortalaması 59.28 ± 13.55 yıl, grup 2'de 58.91 ± 9.43 yıl, grup 3'te 43.02 ± 12.15 yıl olarak bulundu. Her üç grupta yaş ortalamaları arasında anlamlı fark vardı ($p < 0.001$). Diabetes mellitus süresi grup 1'de 15.45 ± 9.62 yıl, grup 2'de ise 11.67 ± 7.29 yıl idi.

Vücut kütle indeksi ortalaması grup 1'de 27.87 ± 5.25 kg/m², grup 2'de 33.19 ± 6.08 kg/m² ve grup 3'de 27.31 ± 4.70 kg/m² olarak tespit edildi. Gruplarda vücut kütle indeksi ortalamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark vardı ($p < 0.001$). Bel çevresi ortalaması grup 1'de 101.05 ± 12.88 cm, grup 2'de 110.46 ± 10.91 cm, grup 3'te ise 96.40 ± 9.90 cm olarak bulundu. Gruplar arasında bel çevresi ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p < 0.001$).

Visseral adipozite indeksi ortalaması grup 1'de 7.29 ± 4.74 , grup 2'de 6.58 ± 3.46 , grup 3'de ise 4.91 ± 2.88 olarak saptandı. Gruplar arasında visseral adipozite indeksi ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p = 0.004$). Adipoz doku disfonksiyonu açısından bakıldığında katılımcıların %77'sinde (n=141) ciddi, %13.1'inde (n=24) orta, %1.1'unda (n=2) hafif adipöz doku disfonksiyonu olduğu görüldü. Onaltı katılımcıda (%8.74) adipöz doku disfonksiyonu saptanmadı.

Sigara kullanım oranının grup 1'de %53.33, grup 2'de %30 ve grup 3'te %11.32 olduğu görüldü. Sistolik kan basıncı ortalaması grup 1'de 122.42 ± 13.82

mmHg, grup 2’de 133.14 ± 15.18 mmHg ve grup 3’te ise 117.26 ± 7.1 mmHg olarak bulundu. Gruplar arasında sistolik kan basıncı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p < 0.001$). Grup 1’de diyastolik kan basıncı ortalamasının 74.83 ± 10.85 mmHg, grup 2’de 81 ± 9.27 mmHg, grup 3’te 76.89 ± 7.54 mmHg olduğu görüldü. Diyastolik kan basıncı ortalamaları arasındaki fark anlamlıydı ($p < 0.001$).

Katılımcıların Framingham risk skorları hesaplandı. Onbir hasta 30 yaş altı olduğundan skorları hesaplanmadı. Framingham risk skoru 41 katılımcının düşük, 4 katılımcının orta, 126 katılımcının ise yüksek olarak geldi.

Açlık plazma glukozu ortalaması grup 1’de 197.67 ± 88.72 mg/dL, grup 2’de 175.09 ± 61.97 mg/dL, grup 3’te ise 87.60 ± 6.80 mg/dL olarak tespit edildi. Gruplar arasında açlık plazma glukozu ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p < 0.001$). Diyabetik ayak tanısı olan ve olmayan toplam 130 Tip 2 diyabetik hastanın Hb1Ac ortalamasının $\%8.86 \pm 1.97$ olduğu görüldü. Grup 1’de $\%9.41 \pm 2.17$, grup 2’de $\%8.40 \pm 1.65$ olarak bulundu ve iki grup arasındaki fark anlamlıydı ($p = 0.004$).

Grup 1’de total kolesterol ortalaması 170.85 ± 51.21 mg/dL, grup 2’de 194.96 ± 43.83 mg/dL, grup 3’te 201.23 ± 46.36 mg/dL olarak saptandı. Total kolesterol ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p = 0.001$).

Grup 1’de HDL-kolesterol ortalaması 36.07 ± 10.61 mg/dL, grup 2’de 45.53 ± 10.09 mg/dL, grup 3’te 48.30 ± 10.17 mg/dL idi. Gruplar arasında HDL-kolesterol ortalamaları açısından fark anlamlıydı ($p < 0.001$). LDL-kolesterol ortalamasının grup 1’de 113.48 ± 39.39 mg/dL, grup 2’de 126.60 ± 29.29 mg/dL, grup 3’te ise 133.92 ± 36.32 mg/dL olduğu görüldü. Gruplar arasında LDL-kolesterol ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p = 0.007$).

Diyabetik ayağı olan diyabetik hastalarda hastalarda trigliserid ortalaması 150.55 ± 76.54 mg/dL, olmayan hastalarda 160.53 ± 68.21 mg/dL, kontrol grubunda

139.04 \pm 73.50 mg/dL olarak saptandı. Gruplar arasında trigliserid ortalamaları arasında anlamlı fark olmadığı görüldü (p = 0.3).

BUN ortalamalarına bakıldığında grup 1'de 25.78 \pm 17.87 mg/dL, grup 2'de 16.43 \pm 7.78 mg/dL, grup 3'te 12.93 \pm 3.33 mg/dL olduğu görüldü. Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıydı (p < 0.001). Kreatinin ortalaması grup 1'de 1.35 \pm 1.23 mg/dL, grup 2'de 0.74 \pm 0.26 mg/dL, grup 3'te 0.73 \pm 0.16 mg/dL olarak saptandı ve aradaki fark anlamlı bulundu (p < 0.001). Demografik, antropometrik veriler ve laboratuvar sonuçları tablo 3'te görülmektedir.

Tablo 3. Demografik, Antropometrik Veriler ve Laboratuvar Sonuçları

	Grup 1 (n=60)	Grup 2 (n=70)	Grup 3 (n=53)	p*
Yaş (yıl)	59.28 ± 13.55	58.91 ± 9.30	43.02 ± 12.15	< 0.001
Cinsiyet (kadın/erkek) (sayı)	19/41	48/22	25/28	< 0.001
VKİ (kg/m ²)	27.87 ± 5.25	33.19 ± 6.08	27.31 ± 4.70	< 0.001
Bel çevresi (cm)	101.05 ± 12.88	110.46 ± 10.91	96.40 ± 9.90	< 0.001
VAİ	7.33 ± 4.43	7.02 ± 3.59	4.91 ± 2.88	0.001
Sigara kullanımı (%) (sayı)	53.33 (32)	30 (21)	11.32 (6)	< 0.001
Sistolik kan basıncı (mmHg)	122.42 ± 13.82	133.14 ± 15.18	117.26 ± 7.17	< 0.001
Diyastolik kan basıncı (mmHg)	74.83 ± 10.85	81 ± 9.27	76.89 ± 7.54	< 0.001
Açlık plazma glukozu (mg/dL)	197.67 ± 88.71	175.09 ± 61.97	87.60 ± 6.80	< 0.001
HbA1c (%)	9.41 ± 2.17	8.40 ± 1.65	5.49 ± 0.28	0.004
Total kolesterol (mg/dL)	170.85 ± 51.21	194.96 ± 43.83	201.23 ± 46.36	0.001
HDL- kolesterol (mg/dL)	36.07 ± 10.61	45.53 ± 10.09	48.30 ± 10.17	< 0.001
LDL-kolesterol (mg/dL)	113.48 ± 39.39	126.60 ± 29.29	133.92 ± 36.32	0.007
Trigliserid (mg/dL)	150.55 ± 76.54	160.53 ± 68.21	139.04 ± 73.50	0.3
BUN (mg/dL)	25.78 ± 17.87	16.43 ± 7.78	12.93 ± 3.33	< 0.001
Kreatinin (mg/dL)	1.35 ± 1.23	0.74 ± 0.26	0.73 ± 0.16	< 0.001
ANGPTL-4 (ng/mL)	12.32 ± 5.58	9.49 ± 2.88	8.33 ± 3.15	< 0.001
FSTL1 (pg/mL)	972.22 (799.83- 1695.45)	842.01 (729.17- 1106.75)	845.07 (527.19- 1059)	0.01

Laboratuvar değerleri ortalama ± SD, FSTL1 için ortanca (IQR) olarak verildi.

ANGPTL-4, angiotensin benzeri protein-4; BUN, blood urea nitrogen; DM, diabetes mellitus; FSTL1, follistatin benzeri 1 protein; HbA1c, hemoglobinA1c; HDL, high-density lipoprotein; IQR, interquartile range; LDL, low-density lipoprotein; SD, standart deviasyon; VAİ, visseral adipozite indeksi; VKİ, vücut kütle indeksi.

* p < 0.05 ise fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Diyabetik hastaların 96 tanesinde (%52.46) mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyon olduğu görüldü. Diyabetik ayak tanısı olan ve olmayan toplam 130 Tip 2 diyabetik hastanın %28.46'sında (n=37) retinopati saptandı. Grup 1'in %45'inde (n=27), grup 2'nin ise %14.29'unda (n=10) diyabetik retinopati tespit edildi ve istatistiksel olarak aradaki fark anlamlı bulundu (p < 0.001). Diyabetik ayak tanısı olan

ve olmayan toplam 130 Tip 2 diyabetik hastanın %9.23'ünde (n=12) background retinopati, %19.23'ünde (n=25) proliferatif retinopati olduğu görüldü.

Periferik duyuşal nöropati sıklığı grup 1'de %96.67 (n=58), grup 2'de %15.71 (n=11), tüm diyabetik hastalarda ise %53.08 (n=69) idi. Grup 1 ve grup 2 arasındaki fark anlamlı bulundu ($p < 0.001$).

Grup 1'deki hastaların %71.67'sinde (n=43), grup 2'dekilerin %30'unda (n=21) nefropati vardı. Grup 1 ve grup 2 arasında nefropati sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p < 0.001$). Diabetes mellitus tanılı 130 hastada proteinüri sıklığı %54.61 (n=71) olarak saptandı. Grup 1'in %70'inde (n=42), grup 2'nin %41.43'ünde (n=29) proteinüri vardı. Grup 1'de mikroalbuminüri sıklığı %30 (n=18), makroalbuminüri %36.66 (n=22), grup 2'de ise mikroalbuminüri sıklığı %21.43 (n=15), makroalbuminüri %11.43 (n=8) olarak saptandı. Grup 1 ve grup 2 arasında makroalbuminüri sıklığı açısından anlamlı fark saptanırken, mikroalbuminüri yönünden her iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı.

Diabetes mellitus tanılı 130 hastanın %53.08'inde (n=69) hipertansiyon tanısı vardı. Diyabetik ayak tanısı olan diyabetik hastaların %46.67'sinde (n=28), olmayan hastaların ise %58.57'sinde (n=41) hipertansiyon tespit edildi.

Koroner arter hastalığı diyabetik ayak tanısı olan ve olmayan toplam 130 Tip 2 diyabetik hastanın %26.92'sinde (n=35) vardı. Sıklığının grup 1'de %40 (n=24), grup 2'de %15.71 (n=11) olduğu görüldü. Serebrovasküler olay (SVO) sıklığı grup 1'de %11.67 (n=7), grup 2'de ise %5.71 (n=4) idi. Periferik arter hastalığı sıklığı diyabetik hastalarda %21.54 (n=28), grup 1'de %45 (n=27), grup 2'de ise %1.43 (n=1) olduğu görüldü. Makrovasküler hastalık görülme oranı diyabetik ayağı olan diyabetik hastalarda %60 (n=36), olmayanlarda %22.86 (n=16) olarak saptandı. Diyabetik ayak tanısı olan ve olmayan diyabetik hastalarda komplikasyon dağılımları tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4. Diyabetik Ayak Tanısı Olan ve Olmayan Diyabetik Hastalarda Komplikasyonların Dağılımı

	Diyabetik ayak tanısı olan Tip 2 DM'li hastalar Sayı (%)	Diyabetik ayağı olmayan Tip 2 DM tanılı hastalar Sayı (%)	<i>p</i> *
Retinopati	27 (45)	10 (14.29)	< 0.001
Background	7 (11.67)	5 (7.14)	0.4
Proliferatif	20 (33.33)	5 (7.14)	< 0.001
Periferik duyuşal nöropati	58 (96.67)	11 (15.71)	< 0.001
Nefropati	43 (71.67)	21 (30)	< 0.001
Mikroalbuminüri	18 (30)	15 (21.43)	0.3
Makroalbuminüri	22 (36.66)	8 (11.43)	0.001
Proteinüri	42 (70)	29 (41.43)	0.001
Hipertansiyon	28 (46.67)	41 (58.57)	0.2
Miyokard infarktüsü öyküsü	13 (21.67)	5 (7.14)	0.02
Koroner arter hastalığı	24 (40)	11 (15.71)	0.002
Periferik arter hastalığı	27 (45)	1 (1.43)	
Serebrovasküler olay	7 (11.67)	4 (5.71)	0.2
Makrovasküler hastalık	36 (60)	16 (22.86)	< 0.001

* $p < 0.05$ ise fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Wagner evrelemede evre 0, 1, 2, 3 ve 4 olan hastaların sayıları sırasıyla 6 (%10), 35 (%58.33), 1 (%1.67), 12 (%20) ve 6 (%10) olarak bulundu. Evre 5 olan hastanın olmadığı görüldü. Hastaların büyük çoğunluğunun Wagner evre 1 olduğu tespit edildi. Evre 2 olan sadece 1 hasta vardı. Diyabetik ayağı olan hastaların 41 tanesinin daha önce diyabetik ayak öyküsü ve 11 tanesinin ise amputasyon öyküsü vardı. Diyabetik ayak nedeniyle daha önce 10 hastaya debridman veya flep ile rekonstrüksiyon yapılmıştı. VAC tedavisi alan 3 hasta vardı. Yatışı sırasında 46 hastanın diyabetik ayak nedeniyle oral veya intravenöz antibiyotik tedavisi aldığı tespit edildi. Aktif osteomyeliti olan 13 hasta vardı. Arterial doppler USG'de anlamlı stenozu olan ise 13 hasta tespit edildi. Diyabetik ayak tanısı olan Tip 2 DM tanılı hastaların özellikleri tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Diyabetik Ayak Tanısı Olan Diyabetik Hastaların Özellikleri

	Hasta sayısı (n)
Diyabetik ayak öyküsü	41
Amputasyon öyküsü	11
Debridman veya flep ile rekonstrüksiyon öyküsü	10
VAC öyküsü	3
Osteomyelit öyküsü	10
Aktif osteomyelit	13
Doppler ultrasonografide anlamlı stenoz	17
Antibiyotik tedavisi	46
Wagner evrelemesi	
0	6
1	35
2	1
3	12
4	6
5	0

VAC, vacuum assisted closure (vakum destekli kapama).

4.2. ANGPTL-4 Sonuçları

ANGPTL-4 düzeyi sonuçları incelendiğinde, bir katılımcının ANGPTL-4 düzeyi uç değerde çıktığı için değerlendirmeye alınmadı. Çalışmaya alınan tüm grupların ANGPTL-4 ortalaması 10.09 ± 4.34 ng/mL olarak bulundu. Grup 1’de 12.32 ± 5.58 ng/mL, grup 2’de 9.49 ± 2.88 ng/mL, grup 3’te 8.33 ± 3.15 ng/mL olarak saptandı. Gruplarda ANGPTL-4 ortalamaları arasındaki fark anlamlıydı ($p < 0.001$) (Grafik 1)

Diyabetik hastalar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında diyabetik hastalarda ANGPTL-4 ortalaması 10.81 ± 4.5 ng/mL, kontrol grubunda 8.33 ± 3.15 ng/mL idi. İki grup arasında ANGPTL-4 ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark

olduğu görüldü ($p < 0.001$). Komplikasyonlu diyabetik hastalarda ANGPTL-4 ortalamasının 11.68 ± 4.96 ng/mL, komplikasyonsuz diyabetik hastalarda ise 8.37 ± 1.46 ng/mL idi. Her iki grup arasında ANGPTL-4 ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu ($p < 0.001$).

ANGPTL-4 ortalaması adipoz doku disfonksiyonları ciddi olanlarda 10.42 ± 4.62 ng/mL, orta olanlarda 9.31 ± 3.49 ng/mL, adipoz doku disfonksiyonu olmayanlarda ise 8.25 ± 1.24 ng/mL idi. Gruplar arasında ANGPTL-4 ortalamaları açısından anlamlı fark olmadığı görüldü ($p = 0.1$).

ANGPTL-4 ortalaması Framingham risk skoru düşük olanlarda 8.55 ± 3.50 ng/mL, orta olanlarda 7.89 ± 2.02 ng/mL, yüksek olanlarda 10.85 ± 4.60 ng/mL olarak geldi. Her üç grubun ANGPTL-4 ortalamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptandı ($p = 0.008$).

Tüm katılımcılarda ANGPTL-4 seviyelerinin yaş, visseral adipozite indeksi, BUN ve kreatinin ile pozitif ilişkili olduğu görüldü. Sırasıyla R değerleri; 0.39, 0.29, 0.50, 0.32 ve p değerleri; < 0.001 , < 0.001 , < 0.001 , < 0.001 olarak bulundu. Total kolesterol, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol ile negatif ilişkilidi (sırasıyla R değerleri; -0.30, -0.35, -0.31, p değerleri; < 0.001 , < 0.001 , < 0.001 , < 0.001).

ANGPTL-4 düzeyleri diyabetik hastalarda yaş, diabetes mellitus süresi, visseral adipozite indeksi, BUN, kreatinin, makroalbuminüri ve proteinüri ile pozitif ilişkili saptandı. Sırasıyla R değerleri; 0.38, 0.42, 0.25, 0.51, 0.50, 0.25, 0.36 ve p değerleri; < 0.001 , < 0.001 , 0.004, < 0.001 , < 0.001 , 0.004, < 0.001 olarak bulundu. Total kolesterol, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyleri ile negatif ilişkili olduğu görüldü (sırasıyla R değerleri; -0.34, -0.36, -0.34, p değerleri; < 0.001 , < 0.001 , < 0.001).

Multipl lineer regresyon analizinde yaş, diabetes mellitus süresi, VAI, BUN, kreatinin, makroalbuminüri ve proteinüri ANGPTL-4 seviyesinin bağımsız

prediktörleri, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol ise negatif prediktörleri olarak bulundu (adjusted R = 0.445, p < 0.001).

Retinopatisi olan diyabetik hastalarda ANGPTL-4 ortalaması 12.10 ± 4.92 ng/mL, olmayanlarda ise 10.33 ± 4.34 ng/mL olarak saptandı. Retinopatisi olan ve olmayan diyabetik hastalarda ANGPTL-4 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi (p = 0.049). ANGPTL-4 ortalaması background retinopatisi olanlarda 10.84 ± 3.14 ng/mL, olmayanlarda 10.81 ± 4.67 ng/mL idi. Background retinopatisi olan ve olmayan diyabetik hastalarda ANGPTL-4 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü (p = 0.98).

Proliferatif retinopatisi olan hastalarda ANGPTL-4 ortalaması 12.66 ± 5.39 ng/mL, olmayanlarda 10.37 ± 4.24 ng/mL olduğu görüldü. Gruplar arasındaki fark anlamlıydı (p = 0.02).

Periferik duyuşal nöropatisi olan tip 2 diyabetik hastalarda ANGPTL-4 ortalaması 12.13 ± 5.28 ng/mL, olmayanlarda ise 9.30 ± 2.92 ng/mL idi. Periferik duyuşal nöropatisi olan ve olmayan hastalarda ANGPTL-4 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi (p < 0.001).

ANGPTL-4 ortalaması diyabetik nefropatisi olan hastalarda 12.49 ± 5.66 ng/mL, olmayanlarda 9.21 ± 2.22 ng/mL olduğu görüldü ve aradaki fark anlamlıydı (p < 0.001).

Hipertansiyon tanısı olan diyabetik hastalarda ANGPTL-4 ortalaması 11.85 ± 5.10 ng/mL, olmayanlarda 9.61 ± 3.51 ng/mL idi. ANGPTL-4 ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p = 0.004).

Tip 2 DM tanısı ve koroner arter hastalığı olan hastalarda ANGPTL-4 ortalamasının 13.04 ± 4.69 ng/mL, olmayanlarda 9.98 ± 4.24 ng/mL olduğu görüldü. Koroner arter hastalığı olan ve olmayan diyabetik hastalarda ANGPTL-4 ortalamaları arasındaki fark anlamlı idi (p = 0.001). Miyokard infarktüsü öyküsü olan diyabetik

hastalarda ANGPTL-4 ortalaması 14.81 ± 4.79 ng/mL, olmayanlarda ise 10.16 ± 4.19 ng/mL olarak saptandı ve aradaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0.001$).

Diabetes mellitus tanısı olan ve SVO geçiren hastalarda ANGPTL-4 ortalaması 11.86 ± 2.79 ng/mL, olmayanlarda ise 10.71 ± 4.68 ng/mL olduğu görüldü. SVO geçiren olan ve olmayan hastalarda ANGPTL-4 ortalamaları arasındaki fark anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Diabetes mellitus ve periferik arter hastalığı olan hastalarda ANGPTL-4 ortalaması 13.88 ± 6.66 ng/mL, olmayanlarda 9.96 ± 3.35 ng/mL olarak saptandı. Periferik arter hastalığı öyküsü olan ve olmayan hastalarda ANGPTL-4 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p = 0.005$). Makrovasküler hastalığı olan diyabetik hastalarda ANGPTL-4 ortalamasının 12.85 ± 5.74 ng/mL, olmayanlarda 9.43 ± 2.84 ng/mL olduğu görüldü ve aradaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı olarak saptandı ($p < 0.001$).

Wagner evrelemesine göre ANGPTL-4 ortalamasının evre 0 olanlarda 9.92 ± 2.78 ng/mL, evre 1 olanlarda 12.06 ± 4.82 ng/mL, evre 3 olanlarda 10.12 ± 3.21 ng/mL, evre 4 olanlarda 17.74 ± 7.99 ng/mL olduğu görüldü. Evre 2 olan bir hastada ise 29.65 ng/mL olarak tespit edildi. Gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p < 0.001$) (Grafik 2).

Diyabetik komplikasyonları olan ve olmayan hastalarda ANGPTL-4 düzeyleri tablo 6'da görülmektedir.

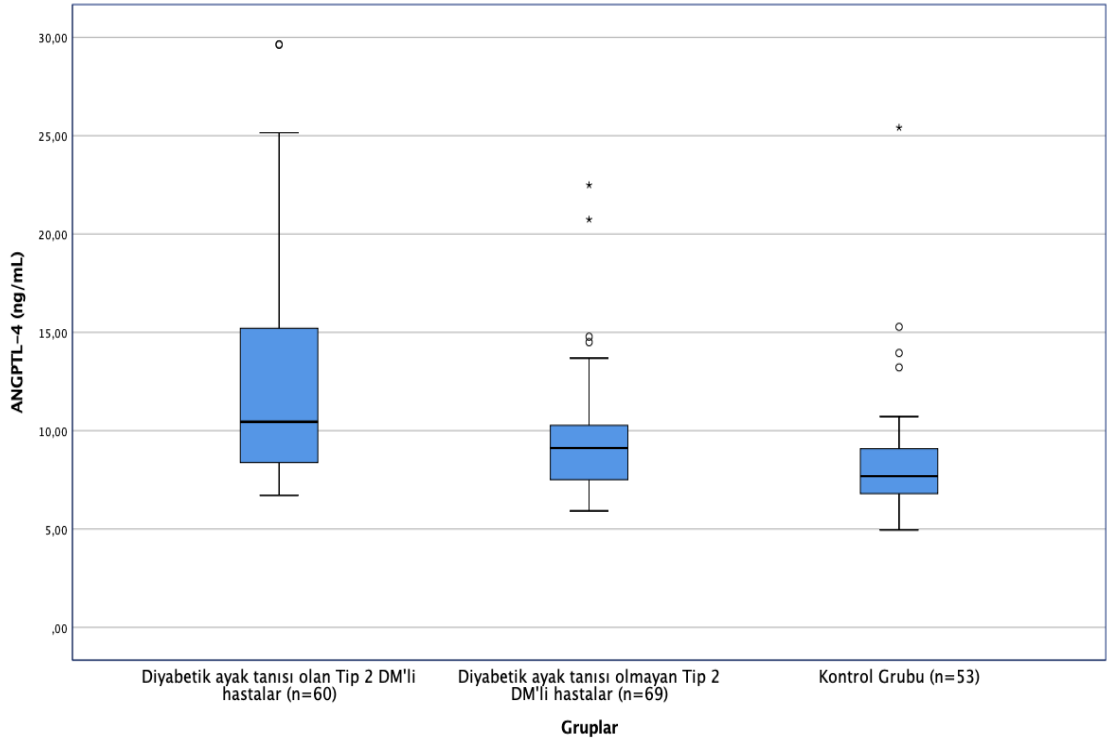
Tablo 6. Diyabetik Komplikasyonları Olan ve Olmayan Hastalarda ANGPTL-4 Düzeyleri

	Komplikasyon olan (ng/mL) (ortalama \pm SD)	Komplikasyon olmayan (ng/mL) (ortalama \pm SD)	<i>p</i> *
Retinopati	12.10 \pm 4.92	10.33 \pm 4.34	0.049
Background	10.84 \pm 3.14	10.81 \pm 4.67	0.98
Proliferatif	12.66 \pm 5.39	10.37 \pm 4.24	0.02
Periferik duyuşal nöropati	12.13 \pm 5.28	9.30 \pm 2.92	< 0.001
Nefropati	12.49 \pm 5.66	9.21 \pm 2.22	< 0.001
Hipertansiyon	11.85 \pm 5.10	9.61 \pm 3.51	0.004
Miyokard infarktüsü öyküsü	14.81 \pm 4.79	10.16 \pm 4.19	< 0.001
Koroner arter hastalığı	13.04 \pm 4.69	9.98 \pm 4.24	0.001
Periferik arter hastalığı	13.88 \pm 6.66	9.96 \pm 3.35	0.005
Serebrovasküler olay	11.86 \pm 2.79	10.71 \pm 4.68	0.4
Makrovasküler hastalık	12.85 \pm 5.74	9.43 \pm 2.84	< 0.001

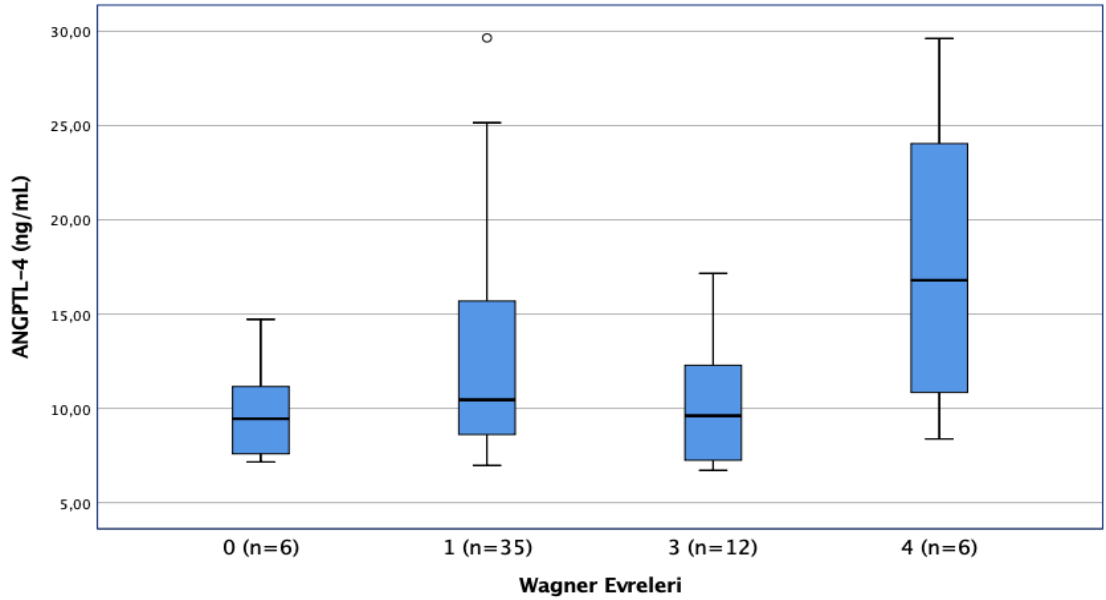
SD, standart deviasyon

* *p* < 0.05 ise fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Grafik 1. Gruplarda ANGPTL-4 Düzeyleri



Grafik 2. Wagner Evrelerine Göre ANGPTL-4 Düzeyleri



(Not: Wagner Evresi 2 olan sadece bir hasta olduğundan grafiğe eklenmedi.)

4.3. FSTL1 Sonuçları

FSTL1 sonuçları incelendiğinde 6 katılımcının FSTL1 düzeyi uç değerde çıktığı için değerlendirmeye alınmadı. Grup 1'de 972.22 (799.83-1695.45) pg/mL, grup 2'de 842.01 (729.17-1106.75) pg/mL, grup 3'te ise 845.07 (527.19-1059) pg/mL olduğu görüldü. Gruplar arasında FSTL1 ortancaları açısından fark anlamlıydı ($p = 0.01$) (Grafik 3).

Diyabetik hastalar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında diyabetik hastalarda FSTL1 düzeyi 896 (747.81-1384.47) pg/mL, kontrol grubunda 845.07 (527.19-1059) pg/mL idi. İki grup arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p = 0.06$).

Komplikasyonlu diyabetik hastalarda FSTL1 düzeyi 937.5 (781.8-1451.67) pg/mL, komplikasyonsuz diyabetik hastalarda 820.31 (707.71-1121.62) pg/mL olarak geldi. İki grup arasındaki fark anlamlı değildi ($p = 0.07$).

Diyabetik hastalarda FSTL1 düzeyleri ile BUN, kreatinin ve makroalbuminüri arasında pozitif ilişki tespit edildi. Sırasıyla R değerleri; 0.21, 0.18, 0.20 ve p değerleri; 0.02, 0.04, 0.02 olarak bulundu. Total kolesterol, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol ile negatif ilişkiliydi (sırasıyla R değerleri; -0.19, -0.28, -0.23, sırasıyla p değerleri; 0.03, 0.001, 0.009). Ayrıca FSTL1 ve ANGPTL-4 arasında pozitif ilişki vardı ($R = 0.23$, $p = 0.01$).

FSTL1 düzeyi adipoz doku disfonksiyonları ciddi olanlarda 889.08 (724.83-1271.7) ng/mL, orta olanlarda 895.87 (697.9-1179.07) ng/mL, adipoz doku disfonksiyonu olmayanlarda ise 874.11 (688.66-1602.42) ng/mL idi. Gruplar arasında FSTL1 ortancaları açısından anlamlı fark olmadığı görüldü ($p = 0.99$).

Periferik duyuşal nöropatisi olan diyabetik hastalarda FSTL1 ortanca değeri 974.66 (800.44-1589.05) pg/mL, olmayanlarda 824.65 (668.4-1102.4) pg/mL olduğu görüldü ve aradaki fark anlamlıydı ($p = 0.002$).

FSTL1 ortalaması retinopatisi olan diyabetik hastalarda 954.86 (809.86-1948.15) pg/mL, olmayanlarda 852.28 (694.44-1166.4) pg/mL idi. Retinopatisi olan ve olmayan hastalarda FSTL1 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p = 0.009$). Proliferatif retinopatisi olan hastalarda FSTL1 ortanca değerinin 954.86 (799.83-1686.7) pg/mL, olmayanlarda 869.77 (697.35-1215.3) pg/mL olduğu görüldü. Gruplar arasındaki fark anlamlıydı ($p = 0.03$).

Framingham risk skoru düşük olanlarda FSTL1 ortanca değeri 783.45 (527.19-1030.57) pg/ml, orta olanlarda 2060.16 (535.74-4332.35) pg/ml, yüksek olanlarda 894.1 (746.95-1295.55) pg/ml olarak geldi. Her üç grubun FSTL1 ortanca değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı görüldü ($p = 0.07$).

Wagner evrelemesine göre FSTL1 ortanca değeri evre 0 olanlarda 889.08 (782.35-1281.4) pg/mL, evre 1 olanlarda 941.9 (798.61-1569.1) pg/mL, evre 3 olanlarda 1144.4 (928.82-2002.3) pg/mL, evre 4 olanlarda 1533.6 (1040.01-2836.45) pg/mL olarak bulundu. Evre 2 olan bir hastada ise 6191.40 ng/mL idi. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı ($p = 0.36$) (Grafik 4).

Diyabetik ayak tanısı olup osteomyeliti olan hastalarda FSTL1 ortanca değerinin 1418.3 (1018.78-4239.15) pg/mL, olmayan hastalarda 935.36 (792.1-1532.62) pg/mL olduğu görüldü. Osteomyeliti olan ve olmayan diyabetik ayak tanılı hastaların FSTL1 ortanca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p = 0.003$).

Background retinopati, diyabetik nefropati, koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı, makrovasküler hastalık olan ve olmayan diyabetik hastalar arasında FSTL1 ortanca değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi.

Diyabetik komplikasyonları olan ve olmayan hastalarda FSTL1 düzeyleri tablo 7'de görülmektedir.

Tablo 7. Diyabetik Komplikasyonları Olan ve Olmayan Hastalarda FSTL1 Düzeyleri

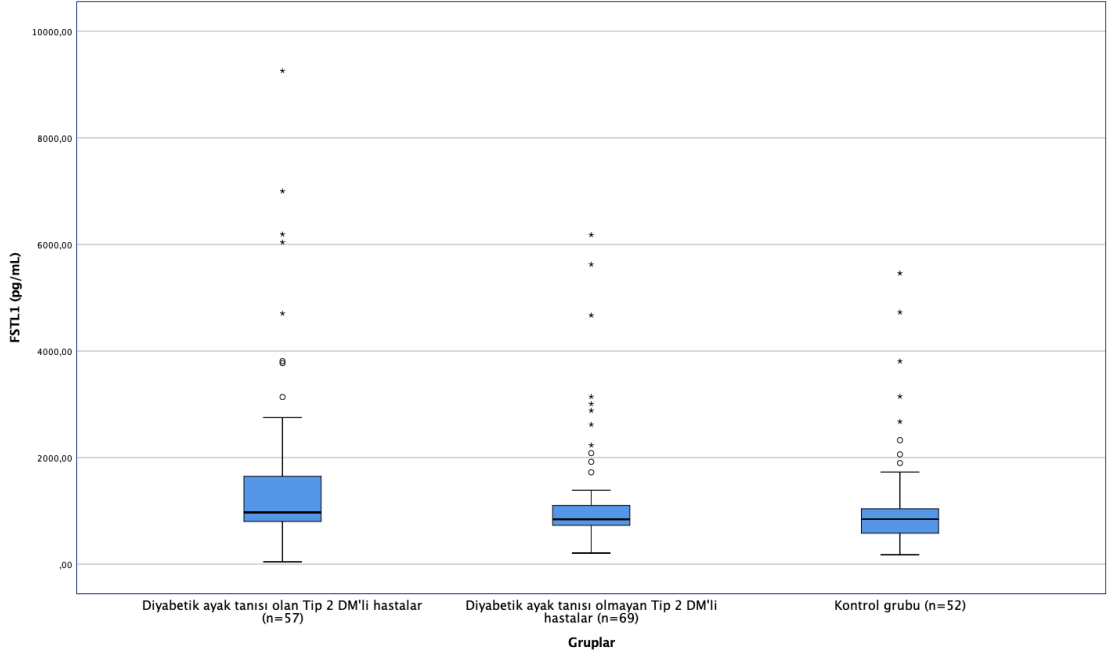
	Komplikasyon olan (pg/mL)	Komplikasyon olmayan (pg/mL)	<i>p</i> *
Retinopati	954.86 (809.86-1948.15)	852.28 (694.44-1166.4)	0.009
Background	1015.61 (823.06-2460.42)	876.74 (712.42-1224)	0.2
Proliferatif	954.86 (799.83-1686.7)	869.77 (697.35-1215.3)	0.03
Periferik duyuşal nöropati	974.66 (800.44-1589.05)	824.65 (668.4-1102.4)	0.002
Nefropati	941.9 (789.93-1532.62)	847.94 (730.26-1157.6)	0.1
Hipertansiyon	928.82 (753.47-1396.25)	868.06 (694.44-1224)	0.1
Miyokard infarktüsü öyküsü	880.28 (670.97-974.66)	891.59 (714.89-1339.7)	0.2
Koroner arter hastalığı	884.68 (778.56-1433.95)	889.08 (703.13-1224)	0.8
Periferik arter hastalığı	915.49 (791.03-1400.65)	876.74 (711.81-1295.55)	0.4
Serebrovasküler olay	867.07 (752.64-1058.5)	889.08 (713.03-1342.6)	0.7
Makrovasküler hastalık	891.59 (785.07-1343.25)	876.74 (694.93-1325.2)	0.6

Laboratuvar değerleri ortanca (IQR) olarak verildi.

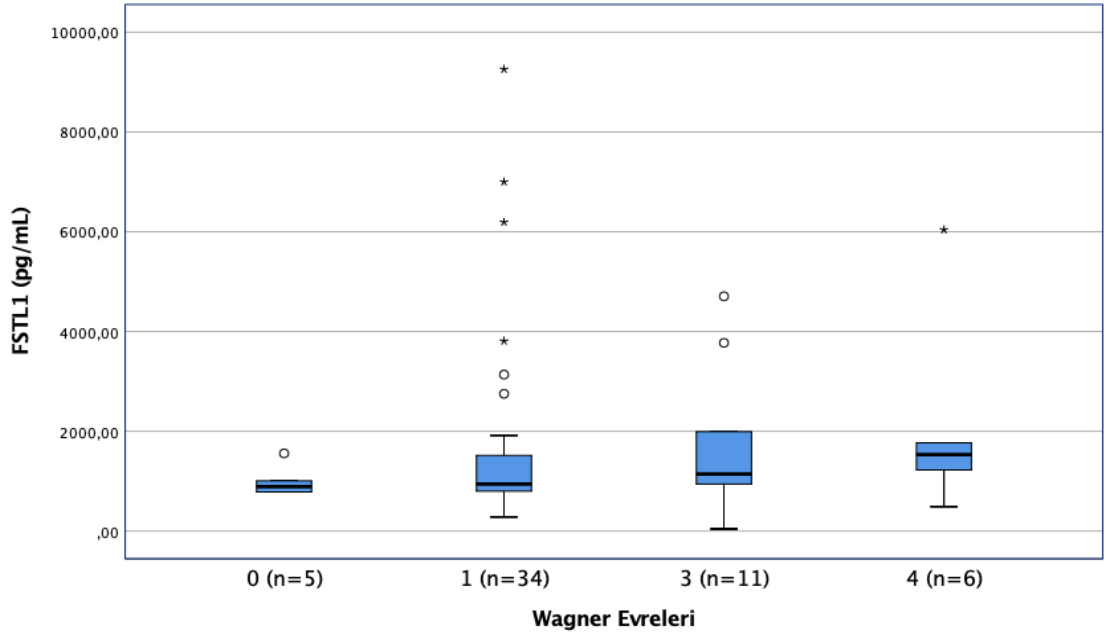
IQR, interquartile range

* $p < 0.05$ ise fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Grafik 3. Gruplarda FSTL1 düzeyleri



Grafik 4. Wagner Evrelerine Göre FSTL1 Düzeyleri



(Not: Wagner Evresi 2 olan sadece bir hasta olduğundan grafiğe eklenmedi.)

4.4. Gen Polimorfizm Sonuçları

Çalışmamızda ANGPTL-4 rs4076317 ve rs1044250 tek nükleotid polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımları Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumlu bulunmuştur.

4.4.1. ANGPTL-4 rs4076317 Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

ANGPTL-4 rs4076317 tek nükleotid polimorfizmi genotip dağılımında diyabetik ayak tanısı olan Tip 2 DM'li hastalar (CC %46.67, CG %41.67, GG %11.67) ve diyabetik ayak tanısı olmayan Tip 2 DM'li hastalar (CC %44.29, CG %44.29, GG %11.43) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Benzer şekilde Tip 2 DM tanılı hastalar (CC %45.38, CG %43.08, GG %11.54) ve kontrol grubu (CC %52.83, CG %39.62, GG %7.55) arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p > 0.05$) (Tablo 8).

C ve G allellerinin dağılımında ise diyabetik ayak tanısı olan Tip 2 DM'li hastalar (C %66.67, G %33.33) ve diyabetik ayak tanısı olmayan Tip 2 DM'li hastalar (C %65, G %35) arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$). Tip 2 DM tanılı 130 hastada C alleli sıklığı %65.77, G alleli sıklığı %34.23 ve kontrol grubunda C alleli sıklığı %75.47, G alleli sıklığı %24.53 olduğu görüldü. C ve G alleli dağılımında her iki grup arasında fark yoktu ($p > 0.05$) (Tablo 9).

ANGPTL-4 rs4076317 tek nükleotid polimorfizmi genotiplerinin demografik, antropometrik veriler, klinik ve laboratuvar bulgular ile ilişki saptanmadı.

4.4.2. ANGPTL-4 rs1044250 Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

Diyabetik ayak tanısı olan Tip 2 DM'li hastalarda ANGPTL-4 rs1044250 tek nükleotid polimorfizmi CC genotipi %70, CT genotipi %26.67, TT genotipi %3.33 oranında olduğu görüldü. Diyabetik ayak tanısı olmayan Tip 2 DM'li hastalarda ise CC genotipi %61.43, CT genotipi %35.71, TT genotipi %2.86 oranında bulundu. İki

grup arasında genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$). Tip 2 DM tanılı hastaların (CC %65.38, CT %31.54, TT %3.08) ve kontrol grubunun (CC %58.49, CT %39.62, TT %1.89) genotip dağılımları arasında anlamlı fark tespit edilmedi ($p > 0.05$) (Tablo 8).

Tip 2 DM tanısı olan hastalarda C alleli %81.54, T alleli %18.46, kontrol grubunda C alleli %77.36, T alleli %22.64 oranında görüldü. C ve T allellerinin dağılımı açısından iki grup arasında fark yoktu ($p > 0.05$). C ve T allellerinin dağılımında diyabetik ayak tanısı olan Tip 2 DM'li hastalar (C %81.67, G %18.33) ve diyabetik ayak tanısı olmayan Tip 2 DM'li hastalar (C %81.43, G %18.57) arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$) (Tablo 9).

ANGPTL-4 rs1044250 tek nükleotid polimorfizminin her 3 genotipinin demografik, antropometrik veriler, klinik ve laboratuvar bulgular ile ilişki saptanmadı.

CT genotipi olan diyabetik hastalarda hipertansiyon sıklığı CC ve TT genotipi olanlara göre (sırasıyla %75.61, %42.7) istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p < 0.001$, OR: 4.16). CT genotipini taşıyan Tip 2 DM tanılı hastaları CC ve TT genotipini taşıyanlara kıyasla açlık plazma glukozu, LDL-kolesterol ve trigliserid seviyelerinin daha düşük olduğu görüldü (sırasıyla $p = 0.006$, $p = 0.02$, $p = 0.01$) (Tablo 10).

Tablo 8. Diyabetik Ayak Tanısı Olan ve Olmayan Tip 2 DM’li Hastalarda ANGPTL-4 rs4076317 ve rs1044250 Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Genotip ve Allel Dağılımları

rs4076317	Diyabetik ayak tanısı olan Tip 2 DM’li hastalar Sayı (%)	Diyabetik ayak tanısı olmayan Tip 2 DM tanılı hastalar Sayı (%)	<i>p</i> *
Genotip			
CC	28 (46.67)	31 (44.29)	> 0.05
CG	25 (41.67)	31 (44.29)	> 0.05
GG	7 (11.67)	8 (11.43)	> 0.05
Allel			
C	80 (66.67)	91 (65)	> 0.05
G	40 (33.33)	49 (35)	> 0.05
rs1044250			
Genotip			
CC	42 (70)	43 (61.43)	> 0.05
CT	16 (26.67)	25 (35.71)	> 0.05
TT	2 (3.33)	2 (2.86)	> 0.05
Allel			
C	98 (81.67)	114 (81.43)	> 0.05
T	22 (18.33)	26 (18.57)	> 0.05

* $p < 0.05$ ise fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 9. Tip 2 DM Tanısı Olan Hastalarda ve Kontrol Grubunda ANGPTL-4 rs4076317 ve rs1044250 Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Genotip ve Allel Dağılımları

	Tip 2 DM tanısı olan hastalar	Kontrol Grubu	<i>p</i> *
	Sayı (%)	Sayı (%)	
rs4076317			
Genotip			
CC	59 (45.38)	28 (52.83)	> 0.05
CG	56 (43.08)	21 (39.62)	> 0.05
GG	15 (11.54)	4 (7.55)	> 0.05
Allel			
C	171 (65.77)	80 (75.47)	> 0.05
G	89 (34.23)	26 (24.53)	> 0.05
rs1044250			
Genotip			
CC	85 (65.38)	31 (58.49)	> 0.05
CT	41 (31.54)	21 (39.62)	> 0.05
TT	4 (3.08)	1 (1.89)	> 0.05
Allel			
C	212 (81.54)	82 (77.36)	> 0.05
T	48 (18.46)	24 (22.64)	> 0.05

* $p < 0.05$ ise fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 10. Diyabetik Hastalarda ANGPTL-4 rs1044250 Tek Nükleotid Polimorfizmi CT ve CC/TT Genotiplerinde Laboratuvar Bulguları ve Diyabetik Komplikasyonların Sıklığı

	CT (n=41)	CC/TT (n=89)	<i>p</i> *
Açlık plazma glukozu (mg/dL)	161.22 ± 58.6	196.7 ± 80.7	0.006
HbA1c (%)	8.4 ± 1.84	9.07 ± 2	0.07
Total kolesterol (mg/dL)	171.39 ± 45.38	189.56 ± 49.36	0.05
HDL-kolesterol (mg/dL)	40.17 ± 11.83	41.62 ± 11.13	0.5
LDL-kolesterol (mg/dL)	110.22 ± 32.12	125.3 ± 35.13	0.02
Trigliserid (mg/dL)	136.51 ± 50.6	164.87 ± 78.69	0.01
BUN (mg/dL)	19.56 ± 12.86	21.29 ± 14.75	0.5
Kreatinin (mg/dL)	0.95 ± 0.85	1.05 ± 0.93	0.5
ANGPTL-4 (ng/mL)	11.73 ± 5.32	10.38 ± 4.11	0.1
FSTL1 (pg/mL)	977.11 (743.04- 1368.85)	876.74 (747.38- 1385.95)	0.3
	Hasta sayısı (%)	Hasta sayısı (%)	
Retinopati	10 (24.39)	28 (31.46)	0.4
Background retinopati	6 (14.63)	14 (15.73)	0.7
Proliferatif retinopati	4 (9.76)	10 (11.23)	0.8
Nefropati	23 (56.1)	43 (48.31)	0.4
Mikroalbuminüri	14 (34.15)	19 (21.35)	0.1
Makroalbuminüri	9 (21.95)	21 (23.59)	0.8
Proteinüri	26 (63.41)	45 (50.56)	0.2
Periferik duyuşal nöropati	19 (46.34)	49 (55.06)	0.3
Hipertansiyon	31 (75.61)	40 (44.94)	0.001
Miyokard infarktüsü öyküsü	6 (14.63)	12 (13.48)	0.9
Koroner arter hastalığı	12 (29.27)	24 (26.97)	0.8
Periferik arter hastalığı	9 (21.95)	20 (22.47)	0.9
Serebrovasküler olay	4 (9.76)	7 (7.86)	0.7

Laboratuvar değerleri ortalama ± SD, FSTL1 için ortanca (IQR) olarak verildi.

ANGPTL-4, angiopoietin benzeri protein-4; BUN, blood urea nitrogen; FSTL1, follistatin benzeri 1 protein; HbA1c, hemogloblinA1c; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; SD, standart deviasyon.

* *p* < 0.05 ise fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada ANGPTL-4 ve FSTL1 düzeyleri ile ANGPTL-4 rs1044250 ve rs4076317 tek nükleotid polimorfizmlerinin diyabetik ayak ve diyabetik komplikasyonlar ile ilişkisi araştırılmıştır. Diabetes mellitus yara iyileşmesi sürecine katılan hücreleri ve çeşitli hormonal faktörleri etkilemektedir. ANGPTL-4 ve FSTL1 inflamasyonda, anjiogenezde ve yara iyileşmesi sürecinde görev alan son yıllarda önemleri artan glikoproteinlerdir. ANGPTL-4 genindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin lipid ve glukoz metabolizması, angiogenez, inflamasyon, yara iyileşmesi ve kardiyovasküler olay riski ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda ANGPTL-4 düzeyleri, Tip 2 diyabetik hastalarda kontrollere göre yüksek olarak bulundu. Benzer şekilde komplikasyonu olan Tip 2 diyabetiklerde, komplikasyon henüz gelişmemiş diyabetiklere oranla ANGPTL-4 düzeyleri daha yüksekti. Tip 2 DM tanısı olan hastalarda ANGPTL-4 düzeyleri ile ilgili yapılan çalışma sayısı oldukça azdır ve bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Xu ve arkadaşları serum ANGPTL-4 düzeylerini Tip 2 DM'lu hastalarda, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulmuşlardır (78). Buna karşın bizim sonuçlarımızı destekleyecek şekilde üç farklı çalışmada ANGPTL-4 düzeyleri Tip 2 diabetes mellituslu hastalarda yüksek bulunmuştur. ANGPTL-4 düzeylerindeki artışa Tip 2 diyabette görülen düşük derecedeki inflamasyonun neden bulunabileceği düşünülebilir. ANGPTL-4 ve CRP düzeyleri arasında gösterilen pozitif ilişki inflamasyonun katkısını desteklemektedir (85, 120, 121).

Sadece aşikar diyabet değil, bozulmuş glukoz toleransı olan obez hastalarda da yüksek ANGPTL-4 düzeylerinin varlığı gösterilmiştir (86). ANGPTL-4'ün yaş, vücut kütle indeksi ve bel çevresi ile, aynı zamanda plazma glukozu, HbA1c, trigliserid ve CRP düzeyleri ile pozitif ilişkisi olduğu bilinmektedir. Buna karşın HDL-kolesterol düzeyleri ile negatif ilişkisi tanımlanmıştır (67, 85, 86). Çalışmamızdaki tüm diyabetik hasta ve kontrol grubunun toplu analizi ile ANGPTL-4 düzeylerinin yaş, visseral adipozite indeksi, BUN ve kreatinin ile pozitif ilişkili olduğu gösterildi. Diyabetik hastaların değerlendirilmesi ise benzer şekilde ANGPTL-4 düzeylerinin yaş, diyabet

süresi, visseral adipozite indeksi, BUN, kreatinin, makroalbuminüri ve proteinüri ile pozitif ilişkisini ortaya koymuştur. Buna karşın çalışmamızı oluşturan tüm gruplarda ve ayrıca diyabetik hastalarda ANGPTL-4 düzeylerinin total kolesterol HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol ile negatif ilişkili olduğu gösterilmiştir. Multipl lineer regresyon analizinde yaş, diabetes mellitus süresi, visseral adipozite indeksi, BUN, kreatinin, makroalbuminüri ve proteinüri ANGPTL-4 düzeylerinin bağımsız prediktörleri iken HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol negatif prediktörleri olarak bulundu.

Literatürde ANGPTL-4 ve trigliserid seviyesi ilişkisi ile ilgili çelişkili veriler mevcuttur. ANGPTL-4 düzeylerinin metabolik sendromu olan hastalarda plazma trigliserid düzeyleri ile pozitif ilişkili olduğu gösterilmiştir (75). Buna karşın iki farklı araştırma sonucunda ANGPTL-4'ün trigliserid düzeylerine etkisi kanıtlanamamıştır (67, 122). ANGPTL-4'ün lipoprotein lipaz enzimi üzerindeki inhibitör etkisi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Çeşitli inhibitor faktörler ve ANGPTL-4'ün farklı formları ANGPTL-4'ün lipoprotein lipaz aktivitesi üzerine etkisini değiştirmektedir (66). Nilsson ve arkadaşları dolaşımda bulunan ANGPTL-4'ün dokuda olan ANGPTL-4'e göre lipoprotein lipaz aktivitesine daha az etkisinin olduğunu göstermişlerdir (69). ANGPTL-4 ve trigliserid ilişkisinde farklı sonuçlar çıkmasında bu faktörler rol oynayabilir.

Çalışmamızda ANGPTL-4 rs1044250 tek nükleotid polimorfizmi CT genotipini taşıyan Tip 2 DM tanılı hastaların homozigot CC ve TT genotipini taşıyanlara kıyasla trigliserid seviyelerinin daha düşük olduğu saptandı. Tüm katılımcılar değerlendirildiğinde de CT genotipi taşıyan katılımcıların trigliserid düzeylerinin homozigot CC ve TT genotipini taşıyanlara göre daha düşük olduğu görüldü. Yapılan çeşitli çalışmalarda ANGPTL-4 genetik varyantları ile trigliserid düzeyleri arasında ilişki mevcut olduğu gösterilmiştir. E40K varyantı taşıyanlarda trigliserid seviyelerinin düşük olduğu saptanmıştır (71, 77). Tunus popülasyonunda yapılan bir çalışmada T266M varyantının ise trigliserid seviyesini daha az etkilediği gösterilmiştir (13). Yapılan bir meta-analizde T266M varyantının trigliserid düzeyleri ile ilişkisi saptanmamıştır (67).

Çalışmamızda incelediğimiz diğer ANGPTL-4 tek nükleotid polimorfizmi rs4076317'nin ise trigliserid ile ilişkisi saptanmamıştır. Bizim sonuçlarımız ile uyumlu olacak şekilde farklı iki araştırmada da rs4076317 tek nükleotid polimorfizmi genotipleri ile trigliserid düzeyleri arasında ilişki saptanmamıştır (12, 123). Diğer lipid parametrelerine bakıldığı zaman çalışmamızda ANGPTL-4 düzeyleri ile HDL-kolesterol, LDL-kolesterol ve total kolesterol arasında negatif bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir. ANGPTL-4 rs1044250 tek nükleotid polimorfizmi CT genotipini taşıyan Tip 2 DM hastalarının homozigot CC ve TT genotipini taşıyanlara kıyasla LDL-kolesterol seviyelerinin daha düşük olduğu tespit edildi. Total kolesterol ve HDL-kolesterol ile bir ilişkisi saptanmadı. Aynı zamanda çalışmamızda ANGPTL-4 rs4076317 tek nükleotid polimorfizmi genotipleri ile total kolesterol, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol arasında ilişki gösterilemedi.

Çalışmamızdaki ile benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda da ANGPTL-4 düzeylerinin HDL-kolesterol ile negatif ilişkisi gösterilmiştir (67, 75). ANGPTL-4 genetik varyantları ile HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyleri ile ilişkisi bilinmektedir. E40K varyantının yüksek HDL-kolesterol düzeylerine eşlik ettiği gösterilmiştir (11, 71). Yang ve arkadaşları ANGPTL-4 rs4976317 polimorfizmi CG ve CC genotipi olanların LDL-kolesterol düzeylerinin GG genotipi olanlara göre daha yüksek olduğu göstermiştir (12).

Literatürde diyabetik komplikasyonlar ve ANGPTL-4 düzeylerinin ilişkisini inceleyen sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar ile ANGPTL-4 arasındaki ilişki detaylı bir şekilde değerlendirildi. Bu bakımdan çalışmamız literatürde ilk olup özgün değer taşımaktadır.

Çalışmamızda ANGPTL-4 seviyelerinin diyabetik retinopatisi olan hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü. Background retinopati ile anlamlı bir ilişki saptanmazken, proliferatif retinopatisi olanlarda ANGPTL-4 düzeyleri daha yüksek saptandı. Diyabetik retinopati patogenezinde angiogenez ve vasküler permeabilitedeki bozukluklar ile düşük düzeyde inflamasyonun etkisi vardır (88, 124).

ANGPTL-4 angiogenez ve inflamasyon üzerindeki etkileri ile diyabetik retinopati patogenezinde rol oynayabilir. İskemik retinopatide ANGPTL-4'ün hipoksik durumda olan retinal Müller hücrelerinde eksprese olarak vasküler permeabiliteyi düzenlediği saptanmıştır (125). ANGPTL-4 ve diyabetik retinal inflamasyon ilişkisini araştıran bir çalışmada ANGPTL-4 düzeylerinin diyabetik farelerde ve yüksek glukozaya maruz bırakılmış insan retinal endotel hücrelerinde yüksek olduğu bulunmuştur. ANGPTL-4'ün bu etkilerini profilin-1 sinyal yolağını aktive ederek inflamasyon, permeabilite ve anjiogenezisi artırarak gösterdiği düşünülmektedir (88). Çalışmamızdan çıkan sonuç ile birlikte değerlendirildiğine ANGPTL-4'ün proliferatif diyabetik retinopati tanısında bir biyomarker ve tedavisinde yeni bir hedef olabileceği söylenebilir.

Yaptığımız bu çalışmada periferik duyuşal nöropatisi olan diyabetik hastalarda da ANGPTL-4 düzeyleri anlamlı olarak daha yüksek saptandı. Periferik duyuşal nöropati diabetes mellitusun periferik sinirlerde hasara yol açan önemli bir komplikasyonudur. Diyabetik nöropati patogenezinde polyol yolağı, ileri glikasyon son ürünleri, oksidatif stres, protein kiraz C aktivitesi ve proinflamatuvar süreç rol oynamaktadır. Polyol yolağı aktivitesinde ve ileri glikasyon son ürünlerindeki artış proinflamatuvar süreci uyarmaktadır. Proinflamatuvar durum MAP-kinaz ve NF-kB yollarını aktive etmekte ve bu durum hücre proliferasyonuna veya ölümüne yol açmaktadır (126-128). MAP kinazlar diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının patogenezinde önemli rol oynamaktadır (129). Diyabetik nöropati patogenezinde ANGPTL-4'ün etkisine dair literatürde veri yoktur. ANGPTL-4'ün C terminal formunun ERK1/2 MAP kinaz sinyal yolağını inhibe ederek anjiogenezini engellediğı bilinmektedir (60). Bu veriler ANGPTL-4'ün diyabetik nöropatide ERK, MAP kinazın aktivitesini değıştirerek etki edebileceğini göstermektedir. Periferik duyuşal nöropatisi bulunan hastalardaki ANGPTL-4 yüksekliğı muhtemelen ANGPTL-4'ün diyabetik nöropati patogenezindeki inflamatuvar duruma katkısı ve anjiogenez üzerindeki etkileri ile açıklanabilir.

Çalışmamızda diyabetik ayak tanısı olan diyabetik hastalarda, diyabetik ayak sorunu olmayanlara göre ANGPTL-4 düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Wagner derecelendirmesine göre, diyabetik ayağın şiddeti ile ilişkili olarak Wagner

evresi artıkça ANGPTL-4 düzeyleri daha yüksek bulunmaktadır. Literatürde diyabetik ayak tanısı olan hastalarda ANGPTL-4 düzeylerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan çalışmamız özgün değer taşımaktadır. ANGPTL-4'ün inflamasyon ile ilişkileri bilinmektedir. Diyabetik ayak patogenezinde inflamatuvar süreçlerdeki değişiklikler önemli rol oynamaktadır (52, 120, 130). ANGPTL-4 makrofajdaki lipoprotein lipazı inhibe ederek inflamatuvar yanıtın başlamasını engellemektedir (59). Galaup ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ANGPTL-4 aktivitesi eksik olan farelerde inflamasyonun şiddetinin arttığı gösterilmiştir (130). Tjeerdema ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada metabolik sendrom ve Tip 2 DM'de inflamasyonun plazma ANGPTL-4 düzeyini artırdığı gösterilmiştir. ANGPTL-4'ün inflamasyonun bir göstergesi olarak kullanılan CRP ile pozitif ilişkisi saptanmıştır (120).

ANGPTL-4 yara iyileşmesinde keratinosit migrasyonu ve reepitelizasyon basamağında rol oynamaktadır (9, 30). Yara iyileşmesi sürecinde doku hasarı oluşan bölgede ANGPTL-4 ekspresyonu artmaktadır. Ancak diyabetik yaraların iyileşme süreci boyunca düşük kaldığı gösterilmiştir (30). Keratinosit migrasyonu sürecinde ANGPTL-4'ün integrin- β 1 ile bağlanır. ANGPTL-4'ün integrin- β 1 ile bağlanması migrasyonda etkili hücre içi yolları aktive etmektedir (31). ANGPTL-4'ün ayrıca reepitelizasyon süresince epidermal diferansiyasyonu uyaran, keratinositlerin proliferasyonu ve migrasyonunda görev alan PPAR β / δ 'ı upregüle ettiği gösterilmiştir (34, 35, 131).

Çalışmamızda ANGPTL-4 düzeyleri diyabetik nefropatisi olan hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterildi. ANGPTL-4 düzeyleri ile albuminüri arasında pozitif bir ilişki saptandı ve bu lineer regresyon analizinde doğrulandı. Mikroalbuminürisi, makroalbuminürisi olan ve albuminürisi olmayan diyabetik hastaların ANGPTL-4 ortalamaları arasında anlamlı fark olduğu bulundu. Diyabetik nefropati gelişiminde podosit hasarı önemli bir rol oynamaktadır (132, 133). ANGPTL-4 böbrekte düşük düzeyde eksprese edilmektedir. ANGPTL-4 podositlerden sekrete edilmekte ve idrarda tespit edilmektedir. Podosit hasarı ile ilişkili minimal değişiklik hastalığı ve membranöz nefropati hastalığında

podositlerden sekrete edilen ANGPTL-4'ün upregüle olduğu gösterilmiştir. ANGPTL-4 geninin değiştirildiği farelerde podosit hasarı ve proteinüri seviyelerinde artış olduğu saptanmıştır. Albuminüri olan diyabetik hastalarda normoalbuminürik olan hastalara göre üriner ANGPTL-4 düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (134).

Clement ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farelerde ANGPTL-4 ekspresyon artışının nefrotik düzeyde proteinüriyi indüklediği ve artırdığı saptanmıştır. ANGPTL-4 geninin korunduğu farelerde ise proteinürinin daha düşük olduğu saptanmıştır (90). Xue ve arkadaşlarının yaptığı diyabetik nefropatili fare modeli çalışmasında benazepril hidrokloridin ANGPTL-4 ekspresyonunu azaltarak diyabetik nefropatide düzelmeye sağladığı ve proteinüriyi azalttığı bulunmuştur (89). Bu çalışmalar sonucunda glomerüler patolojilerde ANGPTL-4'ün proteinüride artışa neden olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda diyabetik hastalarda literatürde ilk kez ANGPTL-4 ile makroalbuminüri ve proteinüri düzeyleri arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır. Çalışmamızdan çıkan sonuçlar ve önceki çalışmalar değerlendirildiğinde ANGPTL-4'ün diyabetik nefropati tespitinde, diyabetik nefropatinin şiddetini göstermede bir biyomarker olarak ve diyabetik nefropati tedavisinde olası bir hedef olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada hipertansiyonu olan ve olmayan diyabetik hastalarda ANGPTL-4 düzeyleri arasında anlamlı fark olduğu saptandı. Çalışmamızdaki diyabetik hastaların 69'unda hipertansiyon tanısı mevcuttu. Abu-Farha ve arkadaşlarının Kuveyt popülasyonunda yaptığı bir çalışmada ANGPTL-4 serum düzeyleri hipertansiyon tanısı olanlarda daha yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda hipertansiyonu olan Tip 2 DM hastalarında da hipertansiyon olmayanlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (91).

Çalışmamızda ayrıca ANGPTL-4 rs1044250 tek nükleotid polimorfizmi CT genotipi olanlarda hipertansiyon sıklığının CC ve TT genotipi olanlara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha fazla olduğu gösterildi. Ayrıca koroner arter hastalığı olan ve miyokard infarktüsü öyküsü olan diyabetik hastalarda da ANGPTL-

4 seviyeleri anlamlı olarak daha yüksekti. ANGPTL-4 rs1044250 ve rs4076317 tek nükleotid polimorfizmi genotip dağılımı koroner arter hastalığı olan ve olmayanlar arasında farklı değildi. Katılımcıların kardiyovasküler risklerini değerlendirmek için kardiyometabolik riski gösteren visseral adipozite indeksi ve Framingham risk skorundan yararlanıldı. Framingham risk skoru düşük, orta ve yüksek olanlarda ANGPTL4 ortalamaları arasında anlamlı fark olduğu görüldü. Ayrıca visseral adipozite indeksi ve ANGPTL-4 arasında da pozitif bir ilişki saptandı ve bu ilişki lineer regresyon analizinde doğrulandı.

Yüksek trigliserid düzeyleri ve kardiyovasküler hastalık riski arasında ilişki mevcut olduğu bilinmektedir. ANGPTL-4 trigliserid ve diğer lipid parametrelerini etkileyerek kardiyovasküler hasar riskini artırabilir (135, 136). ANGPTL-4 genindeki çeşitli tek nükleotid polimorfizmlerinin kardiyovasküler olay riskini etkilediği gösterilmiştir (12, 14, 67, 74, 92). ANGPTL-4 rs1044250 tek nükleotid polimorfizminin ANGPTL-4 C-terminal bölgesinde olduğu bilinmektedir (77). C-terminal formunun etki mekanizmaları tam olarak bilinmese de vasküler permeabilite ve anjiogenezde rolü olduğu bilinmektedir (137). Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada C-terminal formunun endotel hücrelerinde Raf/MEK/ERK1/2 MAP kinaz yolağını inhibe ederek anjiogenezi baskıladığı gösterilmiştir. ANGPTL-4 genindeki varyantlar ANGPTL-4'ün anjiogenik özelliklerini etkilemektedir. E40K varyantında olduğu gibi fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar Raf/MEK/ERK1/2 MAP kinaz yolağının supresyonunu azaltarak anjiogenezi artırabilmektedir (60).

Ateroskleroz sürecinde neovaskülarizasyon önemli rol oynamaktadır. Neovaskülarizasyon angiogenez ile bağlantılıdır. Neovaskülarizasyon aterosklerotik lezyonda inflamasyon ve lipid depolanmasında artışa yol açmakta ve bu da plak destabilizasyonuna ve rüptürüne neden olmaktadır (138). ANGPTL-4 aktivitesinin eksik olduğu farelerde vasküler permeabilite, hemoraji, ödem, inflamasyon ve miyokard enfarktüsünün şiddetinin arttığı gösterilmiştir (130). ANGPTL-4 inhibisyonunun revaskülarizasyonu ve plak instabilitesini artırdığı bildirilmiştir (77). ANGPTL-4 aktivitesini etkileyen çeşitli faktörler ve genetik varyantlar ANGPTL-4'ün yapısını farklılaştırarak anjiogenez üzerindeki işlevini değiştirebilir. ANGPTL-4

rs1044250 tek nükleotid polimorfizmi de endotel hücrelerinde ANGPTL-4'ün aktivitesini azaltarak anjiogenezi ve vasküler permeabilityyi artırıp hipertansiyon ve aterosklerotik kalp hastalığı riskini artırabilir (14).

Çalışmamızda periferik arter hastalığı olan hastalarda ANGPTL-4 düzeylerinin olmayan hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü. Periferik arter hastalığı dokularda yetersiz kan akımına ve hipoksiye yol açan vasküler bir hastalıktır. Endotel hücreleri hipoksiye maruz kalır ve buna yanıt olarak anjiogenez artar. Le Jan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada periferik arter hastalığı olan hastaların iskemik doku örneklerinde sağlıklı dokulara göre ANGPTL-4'ün daha yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir (139). Hipoksiye yanıt olarak ANGPTL-4 subendotelyal ekstraselüler matrikste toplanmaktadır. Ekstraselüler matriks ile sadece tam uzunluktaki ANGPTL-4'ün etkileştiği ve bu etkileşim için ANGPTL-4'nin glikozilasyonunun önem taşıdığı bilinmektedir (61, 140). ANGPTL-4 genindeki polimorfizmlerin angiogenez üzerindeki etkiyi değiştirdiği bilinmektedir (60). Çalışmamızda periferik arter hastalığı olan hastalarda rs1044250 ve rs4076317 tek nükleotid polimorfizmlerinin genotip dağılımında farklılık saptanmamıştır.

Çalışmamızda yara iyileşmesi, inflamasyon ve angiogenez üzerinde etkileri olan bir başka glikoprotein olan FSTL1'in diyabetik ayak ve diyabet komplikasyonları ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Diyabetik ayak tanısı olan hastalarda FSTL1 düzeyleri diyabetik ayak sorunu olmayan hastalara göre anlamlı yüksek saptanmıştır. Diyabetik hastalar ve kontrol grubu arasında FSTL1 ortalamaları arasında anlamlı fark gösterilememiştir. Diyabetik ayak tanısı olup osteomyeliti olan ve olmayan hastaların FSTL1 ortalamaları arasındaki fark anlamlı bulundu. Ayrıca FSTL1 düzeylerinin periferik duysal nöropatisi ve retinopatisi olan diyabetik hastalarda olmayanlara göre seviyesi daha yüksek olarak tespit edildi. Buna karşın background retinopati, proliferatif retinopati, nefropati, periferik arter hastalığı olan ve olmayan diyabetik hastalarda FSTL1 ortalamaları arasındaki fark anlamlı değildi.

Literatürde FSTL1 ile diyabetik ayak ve diyabet komplikasyonlarının değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan çalışmamız özgündür.

FSTL1'in inflamasyonda ve yara iyileşmesinde önemli etkileri mevcuttur. Yara iyileşme sürecinde FSTL1 geni tarafından kodlanan FSTL1 promigratuar, miR-198 antimigratuar etki göstermektedir. Epidermiste hasar olduğu zaman FSTL1 ekspresyonu artmakta, miRNA-198 ekspresyonu ise azalmaktadır. Kronik diyabetik ülserlerde FSTL1 ve miR-198 ekspresyon kaybı olduğu gösterilmiştir. Bu durum keratinosit migrasyonu ve reepitelizasyon sürecini aksatmaktadır (29). Yara iyileşmesinde başka miRNA'ların da etkisinin olduğu gösterilmiştir (141). Xu ve arkadaşları diyabetik farelerin yaralarında miRNA-146a ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir (142). Li ve arkadaşlarının diyabetik hastalarda yaptığı bir çalışmada epidermal keratinositlerde sentezlenen, yara iyileşmesinde inflamatuvar fazdan proliferasyon fazına geçmeyi kolaylaştıran miRNA-132'nin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (143).

FSTL1; TNF- α , IL-6, IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinleri artırmaktadır (100). FSTL1 düzeylerinin birçok sistemik inflamatuvar hastalıkta arttığı bilinmektedir (102). Diyabetik ayak ülserlerinin iyileşme sürecinde TNF- α , IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunda artış görülmektedir (144, 145). FSTL1 ayrıca dokuların iskemiye maruz kalmalarına yanıt olarak salınır ve endotel hücrelerinin migrasyonunu ve diferansiyasyonunu artırır. Bunu PI3K, AKT ve eNOS enzimlerini aktive ederek yapmaktadır (109). Diyabetin vasküler komplikasyonlarında eNOS enzimidaki değişiklikler önemli rol oynamaktadır. Ayrıca nitrik oksitteki azalma diyabetik yara iyileşmesinde iskemi sonrası neovaskülarizasyona etki etmektedir (146, 147). PI3K sinyali nörotrofik etki gösterir ve reaktivasyonu nöronlarda diyabetik nöropati ilişkili hasarı azaltır (148).

FSTL1'in proinflamatuvar etkisinde TLR4 sinyalini aktive etmesinin de rolü vardır (103). TLR ekspresyonundaki değişikliklerin Tip 2 DM tanılı hastalarında yara iyileşmesinde gecikme ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (149). Kanhaiya ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yara bölgesinde TLR4'ün downregüle olmasının yara iyileşmesinde gecikmeye ve Tip 2 DM tanılı hastalarda kronik iyileşmeyen ülserlere neden olduğu bildirilmiştir (150).

Bu çalışmalar sonucunda FSTL1'in proinflamatuvar sitokinleri artırması, angiogenez üzerindeki ve çeşitli hücrel yolaklardaki rolleri nedeni ile diyabetik ayak ve diyabetik komplikasyonların patogeneğinde rolü olabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda koroner arter hastalığı, MI öyküsü, hipertansiyon tanısı olan ve olmayan diyabetik hastalar arasında FSTL1 ortalamaları açısından anlamlı fark olmadığı saptandı. Kalp dokusunda iskemik ve iskemik olmayan hasar durumlarında FSTL1 ekspresyonu artmaktadır. FSTL1'in uyarılması çeşitli hücrel yolaklar aracılığı ile kalp kası hücrelerini hipoksiden ve apoptozdan korumaktadır (107, 108). FSTL1 seviyelerinin akut koroner sendromda arttığı gösterilmiştir (112). FSTL1 kardiyoprotektif etkisi miyokard infarktüsünde gösterilmiştir. FSTL1 ekspresyonu iskemik bölgede geçici olarak artmaktadır. FSTL1 ekspresyonu miyokard infarktüsünden 1 hafta sonra en yüksek düzeyine ulaşmakta ve bir ay sonra normal düzeye gelmektedir. İnfarkt bölgesinde ise ekspresyonu düşük düzeylerde kalmaktadır. Serum düzeylerinin infarkt büyüklüğü ile ilişkisi tespit edilmiştir (152, 153). Çalışmamızda FSTL1 düzeyleri miyokard enfarktüsü geçiren diyabetik hastalarda geçirmeyen hastalara göre daha düşük düzeyde bulunmuş ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamız, ANGPTL-4 ve FSTL1 düzeyleri ile ANGPTL4 rs1044250 ve rs4076317 tek nükleotid polimorfizmlerinin diyabetik ayak ve diyabet komplikasyonları gelişimindeki rolünü değerlendiren ilk çalışma olması nedeniyle literatüre ışık tutacaktır, bu açıdan önemlidir. ANGPTL-4 düzeylerinin proliferatif retinopati, periferik duysal nöropati, diyabetik nefropati, diyabetik ayak, hipertansiyon, koroner arter hastalığı ve periferik arter hastalığı tanısı olan diyabetik hastalarda anlamlı olarak yüksek düzeyde bulunması ANGPTL-4'ün diyabetin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarında bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Diyabetik hastalarda ANGPTL-4 düzeylerinin yaş, diyabet süresi, visseral adipozite indeksi, BUN, kreatinin, makroalbuminüri ve proteinüri ile pozitif ilişkili, total kolesterol, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyleri ile negatif ilişkili olduğu gösterildi. Bu ilişkiler multipl lineer regresyon analizi ile doğrulandı. Multipl lineer regresyon analizinde yaş, diyabet süresi, VAI, BUN, kreatinin, makroalbuminüri ve proteinüri ANGPTL-4 seviyesinin bağımsız prediktörleri, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol ise negatif prediktörleri olarak bulundu.

Çalışmamızda ANGPTL-4 düzeylerine ek olarak ANGPTL-4 genindeki rs1044250 ve rs4076317 tek nükleotid polimorfizmlerinin ANGPTL-4 düzeyleri, diyabetik ayak ve diyabetik komplikasyonlar ile olan ilişkileri incelendi. Bu polimorfizmlerin de değerlendirilmiş olması çalışmamıza artı bir değer katmıştır.

Tip 2 DM tanılı hastalar ve kontrol grubu arasında da genotip dağılımı açısından anlamlı farklılık olmadığı görüldü. Diyabetik ayak tanısı olan ve olmayanlar arasında ANGPTL-4 rs1044250 tek nükleotid polimorfizmi genotip dağılımında anlamlı bir fark saptanmadı.

ANGPTL-4 rs1044250 tek nükleotid polimorfizmi CT genotipini taşıyan diyabetik hastalarda açlık plazma glukozu, LDL-kolesterol ve trigliserid düzeylerinin

daha düşük olduğu görüldü. CT genotipi olan diyabetik hastalarda hipertansiyon görölme riski 4.16 kat artmış olarak bulundu. ANGPTL-4 rs1044250 tek nükleotid polimorfizmi genotipleri ile diğer diyabetik mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

ANGPTL-4 rs4076317 tek nükleotid polimorfizmi genotip dağılımında diyabetik ayak tanısı olan ve olmayanlar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Tip 2 DM tanılı hastalar ve kontrol grubu arasında da genotip dağılımı açısından anlamlı farklılık olmadığı görüldü.

Genetik polimorfizm çalışmalarının çok daha fazla hasta sayısı ile yapılmasının daha farklı sonuçlar elde edilmesine neden olması çalışmamızın kısıtlılığı olarak sayılabilir.

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz FSTL1 düzeyleri ile BUN, kreatinin ve makroalbuminüri arasında pozitif ilişki saptandı. Ayrıca FSTL1 ve ANGPTL-4 arasındaki pozitif ilişki gösterildi. Total kolesterol, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol ile negatif ilişkili tespit edildi. Ancak bu ilişkiler multipl regresyon analizinde doğrulanamadı.

Diyabetik ayak tanısı olan hastarda FSTL1 düzeyleri olmayan diyabetik hastalara göre anlamlı olarak yüksek saptandı. Diyabetik hastalar ve kontrol grubu arasında ise FSTL1 ortalamaları arasında anlamlı fark saptanmadı.

Diyabetik ayak tanısı olup osteomyeliti olan ve olmayan hastaların FSTL1 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Ayrıca FSTL1 düzeylerinin periferik duyuşal nöropatisi ve retinopatisi olan diyabetik hastalarda olmayanlara göre seviyesinin daha yüksek olduğu gösterildi.

Çalışmamız diyabetik ayak ve diyabet komplikasyonları ile ANGPTL-4 düzeylerinin ve ANGPTL-4 rs1044250 ve rs4076317 tek nükleotid polimorfizmlerinin ilişkisini inceleyen özgün bir çalışmadır. Çalışmamızdan çıkan sonuçlar ANGPTL-4

ve FSTL1'in diyabetik ayak ve diyabetik komplikasyonların tanısında bir biyobelirteç olarak ve tedavide olası bir hedef olarak kullanabileceğini göstermesi bakımından oldukça önem taşımaktadır. Bunun için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. [Erişim 07.11.2018]; Erişim adresi: <http://www.who.int/diabetes/en/>
2. Cho, NH., Shaw, JE., Karuranga, S., ve ark., *IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045*. Diabetes Res Clin Pract. 2018 Apr; 138: 271-281
3. Ray, JA., Valentine, WJ., Secnik, K. ve ark., *Review of the cost of diabetes complications in Australia, Canada, France, Germany, Italy and Spain*. Curr Med Res Opin. 2005 Oct;21(10):1617-29.
4. Chun, DI., Kim, S., Kim, J. ve ark., *Epidemiology and Burden of Diabetic Foot Ulcer and Peripheral Arterial Disease in Korea*. J Clin Med. 2019 May 25;8(5). pii: E748.
5. Bowling, FL., Rashid, ST., Boulton, AJ. ve ark., *Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus*. Nat Rev Endocrinol. 2015 Oct;11(10):606-16.
6. Martini, J. *Diabetic foot: detection and prevention*. Rev Med Interne. 2008 Sep;29 Suppl 2: S260-3.
7. Isidori, AM., Venneri, MA., Fiore, D., *Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 in metabolic disorders: therapeutic strategies to restore the highs and lows of angiogenesis in diabetes*. J Endocrinol Invest. 2016 Nov; 39 (11): 1235-1246.
8. *American Diabetes Association. Consensus Development Conference on Diabetic Foot Wound Care: 7-8 April 1999, Boston, Massachusetts*. American Diabetes Association. Diabetes Care. 1999 Aug;22(8): 1354-60. Review.
9. Oike, Y., Akao, M., Kubota, Y. ve ark., *Angiopoietin-like proteins: potential new targets for metabolic syndrome therapy*. Trends Mol Med. 2005 Oct;11(10): 473-9.
10. Arya, AK., Tripathi, K., Das, P. *Promising role of ANGPTL4 gene in diabetic wound healing*. Int J Low Extrem Wounds. 2014 Mar;13(1): 58-63.
11. Kharazmi-Khorassani, S., Kharazmi-Khorassani, J., Rastegar-Moghadam, A. ve ark., *Association of a genetic variant in the angiopoietin-like protein 4 gene with metabolic syndrome*. BMC Med Genet. 2019 Jun 4; 20(1): 97.

12. Yang, Q., Yin, RX., Cao, XL. ve ark., *ANGPTL4 variants and their haplotypes are associated with serum lipid levels, the risk of coronary artery disease and ischemic stroke and atorvastatin cholesterol-lowering responses*. Nutr Metab (Lond). 2018 Oct 5; 15:70.
13. Abid, K., Trimeche, T., Mili, D. ve ark., *ANGPTL4 variants E40K and T266M are associated with lower fasting triglyceride levels and predicts cardiovascular disease risk in Type 2 diabetic Tunisian population*. Lipids Health Dis. 2016 Mar 23; 15:63.
14. Muendlein, A., Saely, CH., Leiberer, A. ve ark., *Angiotensin-like protein 4 significantly predicts future cardiovascular events in coronary patients*. Atherosclerosis. 2014 Dec; 237(2): 632-8.
15. Yang, Y., Mu, T., Li, T. ve ark., *Effects of FSTL1 on the proliferation and motility of breast cancer cells and vascular endothelial cells*. Thorac Cancer. 2017 Nov;8(6): 606-612.
16. Boulton, AJ., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G. ve ark., *The global burden of diabetic foot disease*. Lancet. 2005 Nov 12;366(9498):1719-24.
17. Won, SH., Chung, CY., Park, MS. ve ark., *Risk factors associated with amputation-free survival in patient with diabetic foot ulcers*. Yonsei Med J. 2014 Sep; 55(5): 1373-8.
18. Zhang, P., Lu, J., Jing, Y. ve ark., *Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis (†)*. Ann Med. 2017 Mar; 49(2): 106-116.
19. Driver, VR., Fabbi M., Lavery, LA. ve ark., *The costs of diabetic foot: the economic case for the limb salvage team*. J Vasc Surg. 2010 Sep; 52(3 Suppl): 17S-22S.
20. Zubair, M., Ahmad, J. *Role of growth factors and cytokines in diabetic foot ulcer healing: A detailed review*. Rev Endocr Metab Disord. 2019 Jun; 20(2): 207-217.
21. Hollingshead TS. *Pathophysiology and treatment of diabetic foot ulcer*. Clin Podiatr Med Surg. 1991 Oct; 8(4): 843-55.

22. Arya, AK., Pokharia, D., Tripathi, K. *Relationship between oxidative stress and apoptotic markers in lymphocytes of diabetic patients with chronic non healing wound.* Diabetes Res Clin Pract. 2011 Dec; 94(3): 377-84.
23. Midwood, KS., Williams, LV., Schwarzbauer, JE. *Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix.* Int J Biochem Cell Biol. 2004 Jun; 36(6): 1031-7.
24. Parks, WC. *Matrix metalloproteinases in repair.* Wound Repair Regen. 1999 Nov-Dec; 7(6): 423-32.
25. *Consensus Development Conference on Diabetic Foot Wound Care:* American Diabetes Association. 7-8 April 1999, Boston, Massachusetts. Diabetes Care. 1999 Aug
26. Viswanathan, V., Dhamodharan, U., Srinivasan, V. ve ark., *Single nucleotide polymorphisms in cytokine/chemokine genes are associated with severe infection, ulcer grade and amputation in diabetic foot ulcer.* Int J Biol Macromol. 2018 Oct 15; 118(Pt B): 1995-2000.
27. Lan, CC., Liu, IH., Fang, AH. ve ark., *Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: implications for impaired wound healing in patients with diabetes.* Br J Dermatol. 2008 Nov; 159(5): 1103-15.
28. Fan, N., Sun, H., Wang, Y. ve ark., *Follistatin-like 1: a potential mediator of inflammation in obesity.* Mediators Inflamm. 2013; 2013: 752519.
29. Sundaram, GM., Common, JE., Gopal, FE. ve ark., *'See-saw' expression of microRNA-198 and FSTL1 from a single transcript in wound healing.* Nature. 2013 Mar 7; 495(7439): 103-6.
30. Chong, HC., Chan, JS., Goh, CQ. ve ark., *Angiopoietin-like 4 stimulates STAT3-mediated iNOS expression and enhances angiogenesis to accelerate wound healing in diabetic mice.* Mol Ther. 2014 Sep; 22(9): 1593-604.
31. Goh, YY., Pal, M., Chong, HC. ve ark., *Angiopoietin-like 4 interacts with integrins beta1 and beta5 to modulate keratinocyte migration.* Am J Pathol. 2010 Dec; 177(6): 2791-803.
32. Tan, NS., Icre, G., Montagner, A. ve ark., *The nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta potentiates cell*

- chemotactism, polarization, and migration. Mol Cell Biol. 2007 Oct; 27(20): 7161-75.*
33. Chong, HC., Tan, MJ., Philippe, V. ve ark., *Regulation of epithelial-mesenchymal IL-1 signaling by PPARbeta/delta is essential for skin homeostasis and wound healing. J Cell Biol. 2009 Mar 23; 184(6): 817-31.*
 34. Schmuth, M., Haqq, CM., Cairns, WJ. ve ark., *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. J Invest Dermatol. 2004 Apr; 122(4): 971-83.*
 35. Pal, M., Tan, MJ., Huang, RL. ve ark., *Angiopoietin-like 4 regulates epidermal differentiation. PLoS One. 2011; 6(9): e25377.*
 36. Alkayyali, S., Lyssenko, V. *Genetics of diabetes complications. Mamm Genome. 2014 Oct; 25(9-10): 384-400.*
 37. Singh, K., Agrawal, NK., Gupta, SK. ve ark., Singh K. *A functional single nucleotide polymorphism -1562C>T in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcers. Int J Low Extrem Wounds. 2013 Sep; 12(3): 199-204.*
 38. Wang, Y., Su, Y., Xu, Y. ve ark., *Genetic polymorphism c.1562C>T of the MMP-9 is associated with macroangiopathy in type 2 diabetes mellitus. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jan 1; 391(1): 113-7.*
 39. Amoli, MM., Hasani-Ranjbar, S., Roohipour, N. *VEGF gene polymorphism association with diabetic foot ulcer. Diabetes Res Clin Pract. 2011 Aug; 93(2): 215-219.*
 40. Li, X., Lu, Y., Wei, P. *Association between VEGF genetic variants and diabetic foot ulcer in Chinese Han population: A case-control study. Medicine (Baltimore). 2018 May; 97(20): e10672.*
 41. Dhamodharan, U., Viswanathan, V., Krishnamoorthy, E. ve ark., *Genetic association of IL-6, TNF- α and SDF-1 polymorphisms with serum cytokine levels in diabetic foot ulcer. Gene. 2015 Jul 1; 565(1): 62-7.*
 42. Carbone, C., Piro, G., Merz, V. ve ark., *Angiopoietin-Like Proteins in Angiogenesis, Inflammation and Cancer. Int J Mol Sci. 2018 Feb 1; 19(2). pii: E431.*

43. Jones, N., Iljin, K., Dumont, DJ. ve ark., *Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Apr; 2(4): 257-67.
44. Oike, Y., Yasunaga, K., Ito, Y. ve ark., *Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Aug 5; 100(16): 9494-9.
45. Ito, Y., Oike, Y., Yasunaga, K. ve ark., *Inhibition of angiogenesis and vascular leakiness by angiopoietin-related protein 4*. Cancer Res. 2003 Oct 15; 63(20): 6651-7.
46. Deng, M., Lu, Z., Zheng, J. ve ark., *A motif in LILRB2 critical for Angptl2 binding and activation*. Blood. 2014 Aug 7; 124(6): 924-35.
47. Santulli G. *Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look*. Front Endocrinol (Lausanne). 2014 Jan 23; 5:4.
48. Kersten, S., Mandard, S., Tan, NS. ve ark., *Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene*. J Biol Chem. 2000 Sep 15; 275(37): 28488-93.
49. Kim, I., Kim, HG., Kim, H. ve ark., *Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiopoietin-related protein that prevents endothelial-cell apoptosis*. Biochem J. 2000 Mar 15; 346 Pt 3: 603-10.
50. Yoon, JC., Chickering, TW., Rosen, ED. ve ark., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation*. Mol Cell Biol. 2000 Jul; 20(14): 5343-9.
51. Robciuc, MR., Skrobuk, P., Anisimov, A. ve ark., *Angiopoietin-like 4 mediates PPAR delta effect on lipoprotein lipase-dependent fatty acid uptake but not on beta-oxidation in myotubes*. PLoS One. 2012; 7(10): e46212.
52. Alex, S., Lichtenstein, L., Dijk, W. ve ark., *ANGPTL4 is produced by entero-endocrine cells in the human intestinal tract*. Histochem Cell Biol. 2014 Apr; 141(4): 383-91.
53. Kersten, S., Lichtenstein, L., Steenbergen, E. ve ark., *Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in humans via elevated free fatty acids*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 Jun; 29(6): 969-74.

54. Mandard, S., Zandbergen, F., Tan, NS. ve ark., *The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment.* J Biol Chem. 2004 Aug 13; 279(33): 34411-20.
55. Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T. ve ark., *Angiopietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 14; 103(46): 17450-5.
56. Mandard, S., Zandbergen, F., van Straten, E. ve ark., *The fasting-induced adipose factor/angiopietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity.* J Biol Chem. 2006 Jan 13; 281(2): 934-44.
57. Mattijssen, F., Alex, S., Swarts, HJ. ve ark., *Angptl4 serves as an endogenous inhibitor of intestinal lipid digestion.* Mol Metab. 2013 Nov 20; 3(2): 135-44.
58. Georgiadi, A., Lichtenstein, L., Degenhardt, T. ve ark., *Induction of cardiac Angptl4 by dietary fatty acids is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta and protects against fatty acid-induced oxidative stress.* Circ Res. 2010 Jun 11; 106(11): 1712-21.
59. Lichtenstein, L., Mattijssen, F., de Wit, NJ. ve ark., *Angptl4 protects against severe proinflammatory effects of saturated fat by inhibiting fatty acid uptake into mesenteric lymph node macrophages.* Cell Metab. 2010 Dec 1; 12(6): 580-92.
60. Yang, YH., Wang, Y., Lam, KS. ve ark., *Suppression of the Raf/MEK/ERK signaling cascade and inhibition of angiogenesis by the carboxyl terminus of angiopietin-like protein 4.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 May; 28(5): 835-40.
61. Cazes, A., Galaup, A., Chomel, C. ve ark., *Extracellular matrix-bound angiopietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton.* Circ Res. 2006 Nov 24; 99(11): 1207-15.
62. Yan, L., Xu, MT., Yuan, L. ve ark., *Prevalence of dyslipidemia and its control in type 2 diabetes: A multicenter study in endocrinology clinics of China.* J Clin Lipidol. 2016 Jan-Feb; 10(1): 150-60.

63. Picard, F., Naïmi, N., Richard, D. ve ark., *Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion*. Diabetes. 1999 Mar; 48(3): 452-9.
64. Pollare, T., Vessby, B., Lithell, H. *Lipoprotein lipase activity in skeletal muscle is related to insulin sensitivity*. Arterioscler Thromb. 1991 Sep-Oct; 11(5): 1192-203.
65. Ge, H., Yang, G., Yu, X. ve ark., *Oligomerization state-dependent hyperlipidemic effect of angiotensin-like protein 4*. J Lipid Res. 2004 Nov; 45(11): 2071-9.
66. Sonnenburg, WK., Yu, D., Lee, EC. ve ark. *GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiotensin-like 3 and angiotensin-like 4*. J Lipid Res. 2009 Dec; 50(12): 2421-9.
67. Smart-Halajko, MC., Robciuc, MR., Cooper, JA. ve ark., *The relationship between plasma angiotensin-like protein 4 levels, angiotensin-like protein 4 genotype, and coronary heart disease risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Nov; 30(11): 2277-82.
68. Beigneux, AP., Davies, BS., Bensadoun, A. ve ark., *GPIHBP1, a GPI-anchored protein required for the lipolytic processing of triglyceride-rich lipoproteins*. J Lipid Res. 2009 Apr; 50 Suppl: S57-62.
69. Nilsson, SK., Anderson, F., Ericsson, M. ve ark., *Triacylglycerol-rich lipoproteins protect lipoprotein lipase from inactivation by ANGPTL3 and ANGPTL4*. Biochim Biophys Acta. 2012 Oct; 1821(10): 1370-8.
70. Yoshida, K., Shimizugawa, T., Ono, M. ve ark., *Angiotensin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase*. J Lipid Res. 2002 Nov; 43(11): 1770-2.
71. Romeo, S., Pennacchio, LA., Fu, Y. ve ark., *Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL*. Nat Genet. 2007 Apr; 39(4): 513-6.
72. Romeo, S., Yin, W., Kozlitina, J. ve ark., *Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans*. J Clin Invest. 2009 Jan; 119(1): 70-9.

73. Kim, HK., Youn, BS., Shin, MS. ve ark., *Hypothalamic Angptl4/Fiaf is a novel regulator of food intake and body weight*. Diabetes. 2010 Nov; 59(11): 2772-80.
74. Dewey, FE., Gusarova, V., O'Dushlaine, C. ve ark., *Inactivating Variants in ANGPTL4 and Risk of Coronary Artery Disease*. N Engl J Med. 2016 Mar 24; 374(12): 1123-33.
75. Stejskal, D., Karpíšek, M., Reutová, H. ve ark., *Angiopietin-like protein 4: development, analytical characterization, and clinical testing of a new ELISA*. Gen Physiol Biophys. 2008 Mar; 27(1): 59-63.
76. Yin, W., Romeo, S., Chang, S. ve ark., *Genetic variation in ANGPTL4 provides insights into protein processing and function*. J Biol Chem. 2009 May 8; 284(19): 13213-22.
77. Talmud, PJ., Smart, M., Presswood, E. ve ark., *ANGPTL4 E40K and T266M: effects on plasma triglyceride and HDL levels, postprandial responses, and CHD risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Dec; 28(12): 2319-25.
78. Xu, A., Lam, MC., Chan, KW. ve ark., *Angiopietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 26; 102(17): 6086-91.
79. Wang, Y., Xu, A., Knight, C. ve ark., *Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity*. J Biol Chem. 2002 May 31; 277(22): 19521-9.
80. Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y. ve ark., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med. 2002 Nov; 8(11): 1288-95.
81. Köster, A., Chao, YB., Mosior, M. ve ark., *Transgenic angiopietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism*. Endocrinology. 2005 Nov; 146(11): 4943-50.

82. Semenkovich, CF., Wims, M., Noe, L. ve ark., *Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels.* J Biol Chem. 1989 May 25; 264(15): 9030-8.
83. Ruge, T., Sukonina, V., Kroupa, O. ve ark., *Effects of hyperinsulinemia on lipoprotein lipase, angiopoietin-like protein 4, and glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding protein 1 in subjects with and without type 2 diabetes mellitus.* Metabolism. 2012 May; 61(5): 652-60.
84. Jonker, JT., Smit, JW., Hammer, S. ve ark., *Dietary modulation of plasma angiopoietin-like protein 4 concentrations in healthy volunteers and in patients with type 2 diabetes.* Am J Clin Nutr. 2013 Feb; 97(2): 255-60.
85. Cinkajzlová, A., Mráz, M., Lacinová, Z. ve ark., *Angiopoietin-like protein 3 and 4 in obesity, type 2 diabetes mellitus, and malnutrition: the effect of weight reduction and realimentation.* Nutr Diabetes. 2018 Apr 25; 8(1): 21.
86. Barja-Fernandez, S., Moreno-Navarrete, JM., Folgueira, C. ve ark., *Plasma ANGPTL-4 is Associated with Obesity and Glucose Tolerance: Cross-Sectional and Longitudinal Findings.* Mol Nutr Food Res. 2018 May; 62(10): e1800060.
87. Gusarova, V., O'Dushlaine, C., Teslovich, TM. ve ark., *Genetic inactivation of ANGPTL4 improves glucose homeostasis and is associated with reduced risk of diabetes.* Nat Commun. 2018 Jun 13; 9(1): 2252.
88. Lu, Q., Lu, P., Chen, W. ve ark., *ANGPTL-4 induces diabetic retinal inflammation by activating Profilin-1.* Exp Eye Res. 2018 Jan; 166: 140-150.
89. Xue, L., Feng, X., Wang, C. ve ark., *Benazepril hydrochloride improves diabetic nephropathy and decreases proteinuria by decreasing ANGPTL-4 expression.* BMC Nephrol. 2017 Oct
90. Clement, LC., Avila-Casado, C., Macé, C. ve ark., *Podocyte-secreted angiopoietin-like-4 mediates proteinuria in glucocorticoid-sensitive nephrotic syndrome.* Nat Med. 2011 Jan; 17(1): 117-22.
91. Abu-Farha, M., Cherian, P., Qaddoumi, MG. ve ark., *Increased plasma and adipose tissue levels of ANGPTL8/Betatrophin and ANGPTL4 in people with hypertension.* Lipids Health Dis. 2018 Mar 1; 17(1): 35.

92. Stitzel, NO., Stirrups, KE., Masca, NG. ve ark., *Coding Variation in ANGPTL4, LPL, and SVEP1 and the Risk of Coronary Disease*. N Engl J Med. 2016 Mar 24; 374(12): 1134-44.
93. He, XW., Shen, YG., Zhu, M. ve ark., *Angiopoietin-like protein 4 serum levels and gene polymorphisms are associated with large artery atherosclerotic stroke*. J Neurol Sci. 2016 Mar 15; 362: 333-8.
94. Legry, V., Bokor, S., Cottel, D. ve ark., *Associations between common genetic polymorphisms in angiopoietin-like proteins 3 and 4 and lipid metabolism and adiposity in European adolescents and adults*. J Clin Endocrinol Metab. 2009 Dec; 94(12): 5070-7.
95. Shibanuma, M., Mashimo, J., Mita, A. ve ark., *Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide*. Eur J Biochem. 1993 Oct 1; 217(1): 13-9.
96. Zwijsen, A., Blockx, H., Van Arnhem, W. ve ark., *Characterization of a rat C6 glioma-secreted follistatin-related protein (FRP). Cloning and sequence of the human homologue*. Eur J Biochem. 1994 Nov 1; 225(3): 937-46.
97. Hambrock, HO., Kaufmann, B., Müller, S. ve ark., *Structural characterization of TSC-36/Flik: analysis of two charge isoforms*. J Biol Chem. 2004 Mar 19; 279(12): 11727-35.
98. Wu, Y., Zhou, S., Smas, CM. ve ark., *Downregulated expression of the secreted glycoprotein follistatin-like 1 (Fstl1) is a robust hallmark of preadipocyte to adipocyte conversion*. Mech Dev. 2010 Apr; 127(3-4): 183-202.
99. Mattiotti, A., Prakash, S., Barnett, P. ve ark., *Follistatin-like 1 in development and human diseases*. Cell Mol Life Sci. 2018 Jul; 75(13): 2339-2354.
100. Miyamae, T., Marinov, AD., Sowders, D., *Follistatin-like protein-1 is a novel proinflammatory molecule*. J Immunol. 2006 Oct 1; 177(7): 4758-62.
101. Clutter, SD., Wilson, DC., Marinov, AD. ve ark., *Follistatin-like protein 1 promotes arthritis by up-regulating IFN-gamma*. J Immunol. 2009 Jan 1; 182(1): 234-9.

102. Li, D., Wang, Y., Xu, N. ve ark., *Follistatin-like protein 1 is elevated in systemic autoimmune diseases and correlated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther. 2011 Feb 8; 13(1): R17.
103. Murakami, K., Tanaka, M., Usui, T. ve ark., *Follistatin-related protein/follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor 4*. FEBS Lett. 2012 Feb 17; 586(4): 319-24.
104. Janssens, S., Beyaert, R. *Role of Toll-like receptors in pathogen recognition*. Clin Microbiol Rev. 2003 Oct; 16(4): 637-46.
105. Erridge C. *Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants?* J Leukoc Biol. 2010 Jun; 87(6): 989-99.
106. Dali-Youcef, N., Mecili, M., Ricci, R. ve ark., *Metabolic inflammation: connecting obesity and insulin resistance*. Ann Med. 2013 May; 45(3): 242-53.
107. Oshima, Y., Ouchi, N., Sato, K. ve ark., *Follistatin-like 1 is an Akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart*. Circulation. 2008 Jun 17; 117(24): 3099-108.
108. Ogura, Y., Ouchi, N., Ohashi, K. ve ark., *Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models*. Circulation. 2012 Oct 2; 126(14): 1728-38.
109. Ouchi, N., Oshima, Y., Ohashi, K. ve ark., *Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism*. J Biol Chem. 2008 Nov 21; 283(47): 32802-11.
110. Lara-Pezzi, E., Felkin, LE., Birks, EJ. ve ark., *Expression of follistatin-related genes is altered in heart failure*. Endocrinology. 2008 Nov; 149(11): 5822-7.
111. El-Armouche, A., Ouchi, N., Tanaka, K. ve ark., *Follistatin-like 1 in chronic systolic heart failure: a marker of left ventricular remodeling*. Circ Heart Fail. 2011 Sep; 4(5): 621-7.
112. Widera, C., Horn-Wichmann, R., Kempf, T. ve ark., *Circulating concentrations of follistatin-like 1 in healthy individuals and patients with acute coronary syndrome as assessed by an immunoluminometric sandwich assay*. Clin Chem. 2009 Oct; 55(10): 1794-800.

113. Zhang, W., Wang, W., Liu, J. ve ark., *Follistatin-like 1 protects against hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice*. Sci Rep. 2017 Mar 31; 7: 45820.
114. Maruyama, S., Nakamura, K., Papanicolaou, KN. ve ark., *Follistatin-like 1 promotes cardiac fibroblast activation and protects the heart from rupture*. EMBO Mol Med. 2016 Aug 1; 8(8): 949-66.
115. *2018 ESC/ESH Clinical Practice Guidelines for the management of arterial hypertension*.
116. Wagner ve ark., *The Wagner Diabetic Foot Ulcer Grade Classification System*, 1983.
117. Amato, MC., Giordano, C., Galia, M. ve ark., *Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk*. Diabetes Care. 2010 Apr; 33(4): 920-2.
118. Amato, MC., Giordano, C. *Visceral adiposity index: an indicator of adipose tissue dysfunction*. Int J Endocrinol. 2014; 2014: 730827.
119. D'Agostino RB, Sr., Vasan, RS., Pencina, MJ. ve ark., *General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study*. Circulation. 2008 Feb 12; 117(6): 743-53.
120. Tjeerdema, N., Georgiadi, A., Jonker, JT. ve ark., *Inflammation increases plasma angiopoietin-like protein 4 in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes*. BMJ Open Diabetes Res Care. 2014 Dec 3; 2(1): e000034.
121. Gruppen, EG., Kersten, S., Dullaart, RPF. *Plasma angiopoietin-like 4 is related to phospholipid transfer protein activity in diabetic and non-diabetic subjects: role of enhanced low grade inflammation*. Lipids Health Dis. 2018 Mar 27; 17(1): 60.
122. Staiger, H., Haas, C., Machann, J. ve ark., *Muscle-derived angiopoietin-like protein 4 is induced by fatty acids via peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-delta and is of metabolic relevance in humans*. Diabetes. 2009 Mar; 58(3): 579-89.
123. Staiger, H., Machicao, F., Werner, R. ve ark., *Genetic variation within the ANGPTL4 gene is not associated with metabolic traits in white subjects at an*

- increased risk for type 2 diabetes mellitus.* Metabolism. 2008 May; 57(5): 637-43.
124. Adamis AP. *Is diabetic retinopathy an inflammatory disease?* Br J Ophthalmol. 2002 Apr; 86(4): 363–365.
125. Xin, X., Rodrigues, M., Umapathi, M. ve ark., *Hypoxic retinal Muller cells promote vascular permeability by HIF-1-dependent up-regulation of angiopoietin-like 4.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Sep 3; 110(36): E3425-34.
126. Yagihashi, S., Mizukami, H., Sugimoto, K. *Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go?* J Diabetes Investig. 2011 Jan 24; 2(1): 18-32.
127. Wang, L., Chopp, M., Szalad, A. ve ark., *Angiopoietin-1/Tie2 signaling pathway contributes to the therapeutic effect of thymosin β 4 on diabetic peripheral neuropathy.* Neurosci Res. 2019 Oct; 147: 1-8.
128. Wang, Y., Schmeichel, AM., Iida, H. ve ark., *Enhanced inflammatory response via activation of NF-kappaB in acute experimental diabetic neuropathy subjected to ischemia-reperfusion injury.* J Neurol Sci. 2006 Aug 15; 247(1): 47-52.
129. Tomlinson, DR., *Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications.* Diabetologia. 1999 Nov; 42(11): 1271-81.
130. Galaup, A., Gomez, E., Souktani, R. ve ark., *Protection against myocardial infarction and no-reflow through preservation of vascular integrity by angiopoietin-like 4.* Circulation. 2012 Jan 3; 125(1): 140-9.
131. Tan, NS., Icre, G., Montagner, A. ve ark., *The nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta potentiates cell chemotactism, polarization, and migration.* Mol Cell Biol. 2007 Oct; 27(20): 7161-75.
132. Li, JJ., Kwak, SJ., Jung, DS. ve ark., *Podocyte biology in diabetic nephropathy.* Kidney Int Suppl. 2007 Aug; (106): S36-42.
133. Wolf, G., Ziyadeh, FN. *Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy.* Nephron Physiol. 2007; 106(2): p26-31.

134. Ma, J., Chen, X., Li, JS. ve ark., *Upregulation of podocyte-secreted angiopoietin-like-4 in diabetic nephropathy*. *Endocrine*. 2015 Jun; 49(2): 373-84.
135. Patel, A., Barzi, F., Jamrozik, K. ve ark., *Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Serum triglycerides as a risk factor for cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region*. *Circulation*. 2004 Oct 26; 110(17): 2678-86.
136. Sarwar, N., Danesh, J., Eiriksdottir, G. ve ark., *Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies*. *Circulation*. 2007 Jan 30; 115(4): 450-8.
137. Guo, L., Li, SY., Ji, FY. ve ark., *Role of Angptl4 in vascular permeability and inflammation*. *Inflamm Res*. 2014 Jan; 63(1): 13-22.
138. Moreno, PR., Purushothaman, KR., Sirol, M. ve ark., *Neovascularization in human atherosclerosis*. *Circulation*. 2006 May 9; 113(18): 2245-52. Review.
139. Le Jan, S., Amy, C., Cazes, A. ve ark., *Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma*. *Am J Pathol*. 2003 May; 162(5): 1521-8.
140. Carmeliet P. *Angiogenesis in health and disease*. *Nat Med*. 2003 Jun; 9(6): 653-60.
141. Ozdemir, D., Feinberg, MW. *MicroRNAs in diabetic wound healing: Pathophysiology and therapeutic opportunities*. *Trends Cardiovasc Med*. 2019 Apr; 29(3): 131-137.
142. Xu, J., Wu, W., Zhang, L. ve ark., *The role of microRNA-146a in the pathogenesis of the diabetic wound-healing impairment: correction with mesenchymal stem cell treatment*. *Diabetes*. 2012 Nov; 61(11): 2906-12.
143. Li, D., Wang, A., Liu, X. ve ark., *MicroRNA-132 enhances transition from inflammation to proliferation during wound healing*. *J Clin Invest*. 2015 Aug 3; 125(8): 3008-26.
144. Dhamodharan, U., Teena, R., Vimal Kumar, R. ve ark., *Circulatory levels of B-cell activating factor of the TNF family in patients with diabetic foot ulcer: Association with disease progression*. *Wound Repair Regen*. 2019 Sep; 27(5): 442-449.

145. Jeffcoate, WJ., Game, F., Cavanagh, PR. ve ark., *The role of proinflammatory cytokines in the cause of neuropathic osteoarthropathy (acute Charcot foot) in diabetes*. Lancet. 2005 Dec 10; 366(9502): 2058-61.
146. Kanetsuna, Y., Takahashi, K., Nagata, M. ve ark., *Deficiency of endothelial nitric-oxide synthase confers susceptibility to diabetic nephropathy in nephropathy-resistant inbred mice*. Am J Pathol. 2007 May; 170(5): 1473-84.
147. Tam, JC., Ko, CH., Lau, KM. ve ark., *A Chinese 2-herb formula (NF3) promotes hindlimb ischemia-induced neovascularization and wound healing of diabetic rats*. J Diabetes Complications. 2014 Jul-Aug; 28(4): 436-47.
148. Di, G., Zhao, X., Qi, X. ve ark., *VEGF-B promotes recovery of corneal innervations and trophic functions in diabetic mice*. Sci Rep. 2017 Jan 16; 7: 40582.
149. Singh, K., Agrawal, NK., Gupta, SK. ve ark., *Increased expression of endosomal members of toll-like receptor family abrogates wound healing in patients with type 2 diabetes mellitus*. Int Wound J. 2016 Oct; 13(5): 927-35.
150. Kanhaiya, Agrawal, NK., Gupta, SK. ve ark., *Differential Expression of Toll like Receptor 4 in Type 2 Diabetic Patients with Impaired Wound Healing*. J Diabetes Metab 2013, 4:4
152. Van Wijk, B., Gunst, QD., Moorman, AF. ve ark., *Cardiac regeneration from activated epicardium*. PLoS One. 2012; 7(9): e44692.
153. Maruyama, S., Nakamura, K., Papanicolaou, KN. ve ark., *Follistatin-like 1 promotes cardiac fibroblast activation and protects the heart from rupture*. EMBO Mol Med. 2016 Aug 1; 8(8): 949-66.
154. American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care. 2010 Jan; 33 Suppl 1: S62-9.