

# Tip 2 Diyabetli Bireylerde Mthfr C677T ve A1298C Gen Polimorfizmleri ile Diyabetik Retinopati Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

[Evaluation of the Association of Mthfr C677T and A1298C Gene Polymorphisms with Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes Patients]

Rana Sırmalı<sup>1</sup>,  
Yüksel Koca<sup>1</sup>,  
Gönül Erden<sup>1</sup>,  
Yusuf Aydın<sup>2</sup>,  
Dilek Berker<sup>2</sup>,  
Serdar Güler<sup>2</sup>

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi;  
<sup>1</sup>Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü,  
<sup>2</sup>Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları  
Kliniği.

Yazışma Adresi  
[Correspondence Address]

Dr Gönül Erden

Ankara Numune Hastanesi Cebeci Merkez  
Laboratuvarları, Cebeci / Ankara/Türkiye  
Tel:0312-3621487  
Fax:03123623972  
E-mail:drgonulerden@gmail.com

Kayıt tarihi: 25 Aralık 2007, Kabul tarihi: 3 Nisan 2008  
[Received: 25 December 2007, Accepted: 3 April 2008]

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışma, tip 2 diabetes mellituslu hastalarda diyabetik retinopati ile metilen tetrahidrofolat redüktaz C677T ve A1298C gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla yapılmıştır.

**Gerçek ve Yöntemler:** Çalışmaya, tip 2 diabetes mellitus tanısı ile takip edilen toplam 35 hasta alınmıştır. Bu hastalardan 21'i diyabetik retinopatisi bulunan, 14'ü ise kontrol grubu olarak diyabetik retinopatisi bulunmayan hastalardan seçilmiştir. Metilen tetrahidrofolat redüktaz C677T ve A1298C mutasyonları gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle araştırılmıştır. Homosistein düzeyleri yüksek performans likit kromatografi yöntemi ile çalışılmıştır.

**Bulgular:** Metilen tetrahidrofolat redüktaz mutasyonu açısından diyabetik retinopatisi bulunan ve bulunmayan gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ( $p>0.05$ ). Diyabetik retinopati grubunda 1 (% 4.8) hastada, kontrol grubunda ise 2 (% 14.3) hastada metilen tetrahidrofolat redüktaz C677T homozigot mutasyonu bulunmuştur. Her iki grup arasında mutasyonun bulunup bulunmaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ( $\chi^2=0.555$ ,  $p>0.05$ ). Metilen tetrahidrofolat redüktaz A1298C homozigot mutasyonu diyabetik retinopati grubunda 4 (% 19.0) hastada saptanmıştır. Kontrol grubunda ise A1298C homozigot mutasyonu hiç görülmemiştir ( $\chi^2=0.180$ ,  $p>0.05$ ).

Diyabetik retinopatisi bulunan ve bulunmayan gruplar arasında biyokimyasal parametreler içinden; homosistein düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ), kreatinin ( $p=0.043$ ), mikroalbuminüri ( $p=0.036$ ) ve folik asit ( $p=0.015$ ) düzeyleri arasında ise anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir ( $p<0.05$ ).

**Sonuçlar:** Tip 2 diyabet hastalarında, diyabetik retinopati gelişimi ile metilen tetrahidrofolat redüktaz C677T ve A1298C gen mutasyonları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Daha fazla sayıda vakanın katılımıyla oluşturulacak gruplarda çalışmanın genişletilmesi uygun bir yaklaşım olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Türkiye, metilen tetrahidrofolat redüktaz, polimorfizm, diyabet, diyabetik retinopati

## ABSTRACT

**Objectives:** This study evaluated the association of C677T and A1298C single nucleotide polymorphisms of methylene tetrahydrofolate reductase gene with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients.

**Materials and Methods:** Study subjects comprised of 35 Type 2 diabetes patients. 21 were with diabetic retinopathy, 14 without retinopathy as control subjects. Genotyping of the methylene tetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms was performed by melting curve analysis of the generated amplicons after real-time online polymerase chain reaction. Serum homocysteine levels were measured by high performance liquid chromatography.

**Results:** The methylene tetrahydrofolate reductase C677T and A1298C genotype allele frequencies were not different between diabetic patients with and without retinopathy ( $p>0.05$ ). C677T genotype distribution did not differ between control subjects and type 2 diabetes patients with retinopathy ( $p>0.05$ ). A1298C genotype distribution did not differ between control subjects and type 2 diabetes patients with retinopathy ( $p>0.05$ ). Serum median homocysteine levels were not significantly different between the two groups ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** Methylene tetrahydrofolate reductase C677T and A1298C genotype and allele frequencies were not directly associated with the development of diabetic retinopathy in the study group. However further studies with larger scaled groups should be performed in order to investigate the role of C677T and A1298C single nucleotide polymorphisms of methylene tetrahydrofolate reductase gene in type 2 diabetes patients with diabetic retinopathy.

**Key Words:** Turkey, methylene tetrahydrofolate reductase, polymorphisms, diabetes, diabetic retinopathy

## Giriş

Diabetes Mellitus (DM) gerek kendisi gerekse hayatı tehdit edici komplikasyonları nedeniyle önemli bir sağlık problemidir. Tip 2 formu, değişken oranlarda insülin direnci ve ilerleyici  $\beta$  hücre işlev bozukluğu ile ilişkilidir (1). Genetik faktörler tip 1 DM'ye göre tip 2 diyabette daha fazla rol almaktadır (2). Tip 2 diabetes mellitus tüm diyabet vakalarının % 80-90'ını oluşturur (1). Tip 2 diyabetin ülkemizdeki insidansı % 1.6, prevalansı ise % 3.5-5 arasındadır (3).

Diyabetik hastalarda, makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar en önemli mortalite ve morbidite nedenidir (4). Kan şekeri düzeyinin seyri, lipit metabolizmasındaki değişiklikler, trombosit işlev bozukluğu ve daha birçok etkenin diyabetteki komplikasyonların oluşumunda rolü olduğu düşünülmektedir (5,6).

Diyabetik retinopati (DR), diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından biridir (7). Diyabetik retinopati, genellikle nefropati komplikasyonuna eşlik eder ve çeşitli derecelerde görme kaybına neden olduğu için yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltır (8). Diyabetik retinopatideki temel patoloji mikrooklüzyon ve damar geçirgenliğindeki bozulmadır (9). DM'li hastalarda yapılan çalışmalarda, DR'nin başlama zamanı ve derecesi açısından çok fazla çeşitlilik olduğu gözlenmiştir. DM süresi ve glisemik kontrol gibi sadece bilinen risk faktörleriyle açıklanamayan DR'de genetik faktörlerin de etkili olabileceği belirtilmiştir (10,11). DM'ye yatkınlık ve komplikasyonları ile ilişkisi yönünden araştırılan mutasyonlardan birisi de metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gen polimorfizmidir (12).

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, folat metabolizmasında önemli bir enzimdir (13). İnsan MTHFR geni, kromozom 1p36.3'de yerleşiktir ve 656 amino asitten oluşan MTHFR enzimini kodlar (13). MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar, enzimde inaktivasyona neden olarak, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olur (14). MTHFR enzim eksikliğinin hafif olduğu durumlara popülasyon genelinde oldukça sık rastlanmakta olup, özellikle arterial hastalıkların oluşumunda bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir (15).

MTHFR C677T polimorfizminde, MTHFR enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan C (Sitozin)'nin  $\rightarrow$ T (Timin)'ye değişimi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonu vardır (16). MTHFR geninde belirlenen başka bir mutasyon da, enzimi kodlayan genin 7. ekzondaki 1298. nükleotid olan A (Adenin)'nin  $\rightarrow$ C (Sitozin)'ye değişimi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonudur (17). Bu mutasyonda da diğer mutasyon tipinde olduğu gibi MTHFR aktivitesi azalır. A1298C polimorfizminin, plazma homosistein derişimindeki artışı MTHFR C677T mutasyonu kadar etkilemediği ileri sürülse de, bu mutasyonun önemi henüz tam olarak açıklanamamıştır (18). A1298C ve C677T insan MTHFR gen mutasyonlarının her ikisinin de diyabetik popülasyonlarda sıklığı yüksek

bulunmuştur (19).

Yapılan bazı *in vitro* çalışmalarda homosisteinin vasküler endotel büyüme faktörü (proanjiojenik bir faktör) sentezini artırdığı, dolayısıyla diyabetik retinopati gelişmesinde ve ilerlemesindeki kilit role sahip olabileceği belirtilmiştir (20,21). Bu sebeplerden dolayı C677T polimorfizminin diyabetik retinopati gelişiminde rol oynayan önemli bir faktör olabileceği düşünülmüştür.

DR ve MTHFR C677T mutasyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sun Jiazhong ve arkadaşları, DR'nin MTHFR C677T polimorfizmi ile ilişkili olduğunu ve retinopatinin ilerlemesine katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir (22). Kluijtmans ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da paralel sonuçlar elde edilmiş ve homosisteinin damar duvarı üzerinde meydana getirdiği etki, diyabetik mikroanjyopati ve MTHFR gen mutasyonu arasındaki yakın ilişki ile açıklanmıştır (23). Errera ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, DM ve DR ile MTHFR C677T mutasyonu arasında ilişki olduğuna dair bir kanıt bulamamıştır (7). MTHFR C677T polimorfizminin DR'nin şiddetinde önemli bir rol oynamadığı, DM ve DR için tahmin edici bir belirteç olamayacağı sonucuna varılmıştır (7).

Diyabetik retinopati ile A1298C ve C677T MTHFR gen mutasyonlarının her ikisini de araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. A1298C mutasyonu ile DR ilişkisini araştıran literatür bilgisi kısıtlıdır. Biz çalışmamızda, tip 2 diyabetli hastalarda diyabetin kronik komplikasyonlarından diyabetik retinopati ile birlikte MTHFR enzimi gen mutasyonları (C677T, A1298C), homosistein, dislipidemi, yaş, ürik asit, B12, folik asit, kreatinin, fibrinojen, hsCRP, 24 saatlik idrarda mikroalbumin ve glisemik kontrol parametreleri (açlık kan şekeri, HbA1c) arasındaki ilişkiyi araştırdık.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmaya, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Endokrin servisine, Ağustos-Eylül 2006 tarihleri arasında ADA kriterlerine göre tip 2 DM tanısı ile yatırılan 24'ü kadın, 11'i erkek toplam 35 hasta dahil edildi (Diyabet süresi ortalama >10 yıl). Diyabeti olan fakat retinopatisi olmayan hastalar kontrol grubumuzu oluşturdu (NDR=14). Diğer çalışma grubumuz ise hem diyabeti hem de retinopatisi olan hastalardan oluşmaktaydı (DR=21). Folik asit ve/veya B vitamin kompleksi kullanan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Çalışma, hastane etik kurulundan onay alınarak, etik kurallara uyularak yürütülmüştür. Çalışmaya alınan hastalar, kan şekeri regülasyonu, diyabetik ayak tedavisi ya da diyabetik nöropatiye bağlı şikayetlerin iyileştirilmesi gibi nedenlerle yatırılmış hastalardı. Hastalarda yaş, kan basıncı, vücut kitle indeksi (BMİ), sigara ve alkol kullanıp kullanmadığı, diyabet süresi, diyabete eşlik eden komplikasyonlardan retinopati varlığı sorgulandı. Sigara ve alkol alışkanlığı olanlar çalışma dışında bırakıldı. Hastalardan 24 saatlik idrar toplanarak mikroalbumin düzeyine bakıldı. Ayrıca kanda glukoz,

ürük asit, kreatinin, fibrinojen, HbA1c, B12, folik asit, hsCRP, lipid, homosistein düzeyleri ile MTHFR enzimi gen mutasyonları araştırıldı. Retinopatinin varlığı göz hekimlerince göz dibi muayeneleri yapılarak, göz dibi bulgularına göre retinopati var ya da yok olarak değerlendirildi.

Çalışmaya alınan servis hastalarından (sabah saat 07.00-08.00 arasında), glukoz, ürik asit, kreatinin, B12, folik asit, hsCRP, homosistein ve lipid düzeylerini değerlendirmek üzere 10 mililitrelik kırmızı kapaklı jelsiz tüplere (BD Vacutainer) kanlar alındı. Kanların pıhtılaşması için en az 30 dakikalık bir süre geçtikten sonra 3500 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Serum örnekleri bekletilmeden hemen çalışıldı. HbA1c ve MTHFR enzimi mutasyon analizi için mor kapaklı 4 mililitrelik tüpler (BD Vacutainer) kullanıldı.

HbA1c hemen çalışıldı. Mutasyon analizi için toplanan kanlar DNA eldesi için -20 °C'de bekletildi ve 30 gün içinde çalışıldı. Fibrinojen için, % 3.2 Na-sitrat içeren 2 mililitrelik mavi kapaklı tüpler (BD Vacutainer) kullanıldı ve bekletilmeden çalışıldı. İdrarda mikroalbumin için, hastalara 24 saatlik idrar toplatıldı. Hastalara, toplamaya başladıkları günün sabahında ilk idrarı atmaları söylendi. Ertesi günün sabah idrarı da dahil olacak şekilde toplanan idrarlar bekletilmeden çalışıldı. Homosistein ölçümü ticari kit (Chromsystems Chemicals) kullanılarak isocratic HPLC-fluoresan saptama yöntemi ile gerçekleştirildi.

Parametrelerden tamamı orijinal firma kitleri kullanılarak çalışıldı. Fibrinojen, hsCRP Dade Behring firmasına ait cihazlarda, immünokimyasal metodlarla hsCRP Dade Behring BN2 cihazında; Dade Behring CardioPhase hsCRP kitleriyle, serumda, nefelometrik yöntemle çalışıldı. Aeroset (Abbott) otoanalizöründe glukoz, HbA1c, ürik asit, kreatinin fotometrik yöntemle, mikroalbumin immünotürbidimetrik olarak, Vitamin B12, folik asit ise Architect i2000 SR (Abbott) adlı cihazla kemilüminesan mikropartikül immünokimyasal yöntem ile çalışıldı. Referans aralıkları kit broşürleri esas alınarak belirlendi.

### Mthfr Mutasyon Analizi:

Roche marka Lightcycler 1.5 adlı cihazla, gerçek-zamanlı PCR yöntemiyle çalışıldı. Numuneler tam kandan hazırlandı ve önce DNA ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Bu amaçla Roche-"High Pure PCR Template Preparatiyon Kit" kullanıldı.

### PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) öncesi hazırlık aşaması:

Bu amaçla Artus MTHFR LC PCR kiti kullanılmıştır. İçerisinde negatif ve pozitif kontrol bulunmaktadır.

**Data analizi:** MTHFR'nin C677T polimorfizminde, CC (Alanin/Alanin) homozigot normal, CT (Alanin/Valin) heterozigot ve TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipler görülmektedir (24).

nükleotit	Yaban Tip	Varyant
677	62 °C	53 °C
1298	46 °C	57 °C

Homozigot yaban tip----- negatif (normal)

Homozigot varyant----- homozigot

Heterozigot varyant----- heterozigot

### İstatistiksel Analiz:

Çalışma sonuçları istatistiksel olarak "The Statistical Package for Social Science for Windows (SPSS 9.0)" programı ile değerlendirildi. Sayısal verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Kruskal-Wallis testi ile incelendi. Normal dağılıma uyan veriler ortalama  $\pm$  S.D. olarak verildi ve iki grup ortalamasının karşılaştırılmasında t testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen veriler ortanca (minimum-maksimum / aralık) olarak verildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin karşılaştırılmasında, gruplar arası farkı bulmak için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. DR ve NDR (kontrol) grubundaki hastaların kategorik değişkenlerinin, MTHFR genindeki 677C→T ve 1298A→C mutasyonları açısından karşılaştırılmasında  $\chi^2$  testi kullanılmıştır. Tüm testler için anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

### Bulgular

Çalışmaya alınan 35 DM'li hastanın, 24'ü erkek, 11'i kadındı. Hastaların yaş ortalaması  $60.17 \pm 10.46$  yıl (46-75) idi. DR'li hasta ve kontrol grubunun özellikleri ve ölçülen değerleri Tablo 1-5'te gösterilmiştir. Yaş, cinsiyet, BMİ bakımından iki grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p > 0.05$ ) (Tablo 1). Bunun gibi, her bir tabloya atıf, uygun yerlerde yapılmalıdır. AKŞ, HbA1c, diyabet süresi, kreatinin, mikroalbuminüri, sistolik ve diastolik basınç düzeyleri, iki grup arasında değerlendirildiğinde kreatinin ve mikroalbuminüri açısından anlamlı bir fark tespit edildi ( $p < 0.05$ ) (Tablo 2). DR ve kontrol grupları arasında vitamin B12, folik asit, homosistein, hsCRP, ürik asit ve fibrinojen düzeyleri karşılaştırıldığında, yalnızca folik asit değerleri arasında anlamlı bir fark tespit edildi ( $p < 0.05$ ) (Tablo 2). DR ve kontrol grupları arasında total kolesterol, LDL, VLDL, HDL ve trigliserid düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir fark tespit edilememiştir ( $p > 0.05$ ) (Tablo 3).

DR grubunda 1 hastada (% 4.8) MTHFR C677T mutasyonu mevcuttur. NDR (kontrol) grubunda ise 2 hastada (% 14.3) MTHFR C677T mutasyonu mevcuttur (Tablo 4). Her iki grup arasında mutasyonun bulunup bulunmaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $\chi^2 = 0.555$ ,  $p > 0.05$ ).

DR grubunda 4 hastada (% 19.0) MTHFR A1298C mutasyonu mevcuttur. NDR (kontrol) grubunda ise MTHFR A1298C mutasyonu mevcut değildir (Tablo 5). Her iki grup arasında mutasyonun bulunup bulunmaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $\chi^2 = 0.180$ ,  $p > 0.05$ ). Heterozigotlar da dikkate

alınarak A ve C allellerinin sıklığı hesaplandığında; DR grubunda A alleli 0.62 ve C alleli 0.38 bulunmuştur. NDR grubunda ise A alleli 0.82 ve C alleli 0.18 bulunmuştur. Heterozigotlar da dikkate alınarak, A ve C allellerinin sıklığı hesaplanmalı ve değerlendirilmelidir.

## Tartışma

MTHFR C677T polimorfizminin DM'li hastalarda endotel fonksiyonlarında bozulma, ateroskleroz, aterotromboz ve retinopati gibi komplikasyonların oluşma-

sına neden olan faktörlerden olabileceği bildirilmiştir (25,26). MTHFR C677T polimorfizminin diyabetik retinopati gelişiminde rol oynayan önemli bir faktör olabileceği düşünülmüş ve bu konuda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmada, DR ile MTHFR gen mutasyonlarından C677T ve A1298C arasındaki ilişki araştırıldı ve anlamlı bir ilişki bulunamadı. MTHFR gen mutasyonlarından A1298C'nin de incelenmiş olması çalışmamızı diğerlerinden ayıran bir yönüdür. Bu konuda yayınlanmış çalışmalarda daha çok MTHFR C677T polimorfizmi araştırılmıştır.

**Tablo 1.** DR ve NDR (kontrol) grupları arasında yaş, BMİ, AKŞ, HbA1c, diyabet süresi, sistolik ve diastolik basınç düzeylerinin karşılaştırılması

	DR (N=21) Ortalama ± SD	NDR KONTROL (N=14) Ortalama ± SD	p
Yaş (yıl)	59.81 ± 11.66	60.71 ± 8.78	0.987
BMİ (kg/m <sup>2</sup> )	29.57 ± 6.84	27.38 ± 5.01	0.439
AKŞ (mg/dl)	182.95 ± 77.01	177.21 ± 92.33	0.613
HbA1c (%)	9.37 ± 2.48	9.51 ± 2.60	0.880
Diyabet süresi (yıl)	13.59 ± 6.59	11.36 ± 6.65	0.296
Sistolik kan basıncı (mm-Hg)	132.62 ± 26.34	125.71 ± 21.02	0.514
Diastolik kan basıncı (mm-Hg)	81.90 ± 13.27	75.00 ± 10.19	0.201

**Tablo 2.** DR ve NDR (kontrol) grupları arasında vitamin B12, folik asit, homosistein, hsCRP, ürik asit, kreatinin, mikroalbuminüri, ve fibrinojen düzeylerinin karşılaştırılması

	DR (N=21) Ortanca (min-maks)	NDR KONTROL (N= 14) Ortanca (min-maks)	p
B12 (pg/ml)	326 (142-980)	305 (132-1020)	0.762
Folik asit (ng/ml)	4.5 (2.6-10.6)	6.1 (1.9-14.7)	0.015
Homosistein (µmol/L)	16.9 (8.6-37)	15.2 (6-44)	0.289
hsCRP (mg/L)	4.2 (1-22)	5.9 (1-10)	0.866
Ürik asit (mg/dl)	5.1 (2.5-10.2)	4.6 (1.6-8)	0.089
Fibrinojen (mg/dl)	510 (234-840)	377 (197-760)	0.329
Kreatinin (mg/dl)	1.3 (0.6-2.6)	0.8 (0.6-1.9)	0.043
Mikroalbuminüri (mg/24saat)	24 (0.03-112)	1.2 (0.09-83)	0.036

**Tablo 3.** DR ve NDR (kontrol) grupları arasında total kolesterol, LDL, VLDL, HDL ve trigliserid düzeylerinin karşılaştırılması

	DR (N=21) Ortalama ± SD	NDR KONTROL(N=14) Ortalama ± SD	p
T. Kolesterol(mg/dl)	175.67 ± 32.53	168.86 ± 32.53	0.533
LDL (mg/dl)	104.81 ± 40.91	99.78 ± 21.00	0.840
VLDL (mg/dl)	35.84 ± 28.44	29.78 ± 14.06	0.711
HDL (mg/dl)	35.09 ± 8.38	39.28 ± 8.22	0.177
Trigliserid (mg/dl)	179.19 ± 142.19	148.9 ± 70.31	0.711



Sun Jiazhong ve arkadaşları, DR'nin MTHFR C677T polimorfizmi ile ilişkili olduğunu ve retinopatinin ilerlemesine katkıda bulunduğunu bildirmiştir. Özellikle TT ve CT genotipli bireylerde plazma homosistein düzeyinin belirgin olarak yükseldiği gösterilmiştir (22). Klujtmans ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da paralel sonuçlar elde edilmiş ve homosisteinin damar duvarı üzerinde meydana getirdiği etki, diyabetik mikroanjiyopati ve MTHFR gen mutasyonu arasındaki yakın ilişki ile açıklanmıştır (23). Errera ve arkadaşları, yaptığı çalışmada, DM ve DR ile MTHFR C677T mutasyonu arasında ilişki olduğuna dair bir kanıt bulamamıştır. MTHFR C677T polimorfizminin DR'nin şiddetinde önemli bir rol oynamadığı, DM ve DR için bir belirteç olamayacağı sonucuna varılmıştır (7).

Zintzaras ve arkadaşlarının bildirmiş olduğu, bu konudaki en geniş çalışma olan bir meta-analizde, 2004 yılından önce C677T polimorfizmi ile DR ilişkisi üzerine yapılan tüm çalışmalar gözden geçirilmiştir (27). 5 çalışmada MTHFR geni C677T polimorfizmi ile DR arasında sınırlı bir ilişki saptanmış ve çalışma sonuçları arasında geniş bir heterojenite olduğu belirtilmiştir. DR'nin, çok etkenli etiyojolojiye sahip kompleks bir hastalık olduğu, MTHFR C677T polimorfizminin bazı spesifik vakalarda önemsiz patogenetik katkı sağlayabileceği ve diğer bazı faktörlerle biraraya geldiğinde dışlanamayacak bir faktör olduğu belirtilmiştir. Bu konuda daha büyük ve ayrıntılı çalışmalara ihtiyacın olduğu sonucuna varılmıştır (27). Görüldüğü gibi MTHFR C677T mutasyonu ile ilgili çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca A1298C mutasyonu ile diyabetik retinopati ilişkisini inceleyen literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Çalışmamızda homosistein düzeyleri açısından gruplar arasında fark tespit edilememiştir. Bu çalışmada her iki grup DM'li hastalardan oluşmaktadır. Ancak yapılan bazı çalışmalarda total homosistein düzeyi ortalama 5–15 µmol/L olarak sunulmuş ve total homosistein dü-

zeyinin 10–15 µmol/L arasında olması önemli bir risk faktörü olarak bildirilmiştir (28). Bu açıdan bakıldığında üst sınır 10 µmol/L kabul edilir ise bizim çalışmamıza alınan tüm bireylerin bu genel risk grubuna girdiği görülür.

Diyabetik hastalarda önce retinopati, arkasından nefropati gelişir (29). Bizim çalışmamızda DR grubunda kontrol grubuna göre mikroalbuminüri ve kreatinin değerlerinin yüksek bulunması ve istatistiksel olarak anlamlı olması retinopati komplikasyonu oturmuş hastaların nefropati kliniğinin de gelişmekte olduğunu desteklemektedir. Fujita ve arkadaşları, uzun süredir hiperglisemik seyreden ve proliferatif diyabetik retinopati gelişmiş tüm vakalarda yüksek serum kreatinin düzeyleri saptamışlardır (30).

Bazı genetik faktörler tromboza eğilimi arttırmaktadır. Bunlardan biri olan MTHFR C677T mutasyonu, özellikle folik asit düşüklüğü olan bireylerde tromboembolik olaylara neden olabilmektedir. Çünkü folik asit düzeyi düştüğünde bu genetik enzim bozukluğu hiperhomosisteinemiye tetikleyebilmektedir (31). Bizim çalışmamızda folik asit değerleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). DR grubundaki folik asit değerleri, kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur.

Homosisteinin metiyonine remetilasyonunun normal şekilde sağlanabilmesi için diyetle alınan folik asit miktarının artırılması gerekmektedir. Dışardan fazla miktarda folik asit alınmadığı takdirde DNA hipometilasyonu oluşabilir (32). Bu noktada akla gelen bir araştırma konusu diyabet hastalarına tanı konulduğu andan itibaren koruyucu amaçlı folik asit alımının önerilebilirip önerilemeyeceğidir. Makiko ve arkadaşlarına ait bir çalışmada da, özellikle C677T polimorfizmi olan diyabet hastalarında, yüksek folat diyeti gibi serum homosistein düzeyini azaltan uygulamaların, DR başlangıcını engelleyebileceği, DR gelişmiş olgularda da ilerlemesini geciktirebileceği bulunmuştur (33).

**Tablo 4.** DR ve NDR (kontrol) grubundaki hastaların MTHFR677C→T mutasyonu açısından dağılımı ve yüzdeleri

MTHFR677T	DR		NDR (kontrol)		TOPLAM	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
CC	10	47.6	5	35.7	15	42.9
CT	10	47.6	7	50	17	48.6
TT	1	4.8	2	14.3	3	8.6
TOPLAM	21	100	14	100	35	100

**Tablo 5.** DR ve NDR (kontrol) grubundaki hastaların MTHFR1298A→C mutasyonu açısından dağılımı ve yüzdeleri

MTHFR1298C	DR		NDR (kontrol)		TOPLAM	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
AA	9	42.9	9	35.7	18	51.4
AC	8	38.1	5	50.0	13	37.1
CC	4	19.0	---	---	4	11.4
TOPLAM	21	100.0	14	100.0	35	100.0

Çalışma grubumuzun küçük olması bir dezavantaj oluşturmaktadır. A1298C mutasyonu ile ilgili literatür bilgisi kısıtlıdır. Yüksek vaka sayılarıyla yapılacak geniş çaplı bir çalışma, bu mutasyonun üzerinde durulması gereken bir risk faktörü olup olmadığı konusunda daha net sonuçlara ulaşmamızı sağlayacaktır.

Bu çalışmamızda diyabetik retinopati gelişimi ile MTHFR gen mutasyonları varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulamadık. Daha geniş vaka grubuyla ve sağlıklı kontrol grubunun varlığında çalışmanın genişletilmesi uygun bir yaklaşım olacaktır.

## Kaynaklar

- [1] Büyük D, Yılmaz MT, Satman İ, Dinçay N, Karşıdağ K, Altuntaş Y. (1996) Diyabetolojiye Giriş, Laboratuvar ve klinik Tanı Kriterlerinin Standardizasyonu.
- [2] Huang E-J. (2006) Homocysteine and other biochemical parameters in type 2 diabetes with different diabetic duration or diabetic retinopathy. *Clinica Chimica Acta*. 366: 293–298.
- [3] Bağrıaçık N. (1997) Tanı, komplikasyonlara yaklaşım ve tedavi konsensus el kitabı, Nova Nordisk diyabet servisi yayınları, İstanbul.
- [4] National Diabetes Data Group. (1995) Diabetes in America. Bethesda: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.
- [5] Huang E-J. (2006) Homocysteine and other biochemical parameters in type 2 diabetes with different diabetic duration or diabetic retinopathy. *Clinica Chimica Acta*. 366: 293–298.
- [6] Książek P, Bednarek-Skublewska A, Buraczyńska M. (2004) The C677T MTHFR gene mutation and nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Monit*. 10(2): 47–51.
- [7] Errera FIV. (2006) Effect of polymorphisms of the MTHFR and APOE genes on susceptibility to diabetes and severity of diabetic retinopathy in Brazilian patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 39: 883–888.
- [8] Yenigün M. (1997) Kardiyovasküler Diyabet. I.Ü basımevi ve Film Merkezi İstanbul.
- [9] Kochner E. (1993) Diabetic retinopathy. *BMJ*. 307: 1195–1199.
- [10] Leslie RD, Pyke DA. (1982) Diabetic retinopathy in identical twins. *Diabetes*. 31: 19–21.
- [11] Rema M, Saravanan G, Deepa R, Mohan V. (2002) Familial clustering of diabetic retinopathy in South Indian type 2 diabetic patients. *Diabet Med*. 19: 910–916.
- [12] Warpeha KM, Chakravarthy U. (2003) Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy. *Eye*. 17: 305–311.
- [13] Homberger G, Linnebank M, Winter C. (2000) Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet*. 8: 725–729.
- [14] Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH. (2000) Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate-adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr*. 130: 2238–2242.
- [15] Rady PL, Tyring SK, Hundnall SD. (1999) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): The incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet*. 86: 380–384.
- [16] Schneider JA, Rees DC, Liu YT. (1998) Worldwide distribution of a common MTHFR mutation. *Am J Hum Genet*. 62: 1258–1260.
- [17] Morita H, Kurihara H, Tsubaki S, Sugiyama T, Hamada C, Kurihara Y, Shindo T, Ohhashi Y, Kitamura K, Yazaki Y (1998) Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphism and Ischemic Stroke in Japanese. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 18: 1465–1469.
- [18] Markus HS, Ali N, Swaminathan R, Sankaralingam A, Molloy J, Powell J. (1997) A common polymorphism in the MTHFR gene, homocysteine, and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke*. 28: 1739–1743.
- [19] Shpichinetsky V, Raz I, Friedlander Y. (2000) The association between two common mutations C677T and A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk for diabetic nephropathy in type II diabetic patients. *J Nutr*. 130: 2493–2497.
- [20] Roybal CN, Yang S, Sun CW, Hurtado D, Vander Jagt DL, Townes TM, Abcouwer SF. (2004) Homocysteine increase the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem*. 279: 14844–14852.
- [21] Ray D, Mishra M, Ralph S, Read I, Davies R, Brenchley P. (2004) Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. *Diabetes*. 53: 861–864.
- [22] Sun J, Xu Y, Zhu Y, Lu H, Deng H, Fan Y, Sun S, Zhang Y. (2003) The relationship between MTHFR polymorphism, plasma homocysteine levels and diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Chinese Medical Journal*. 116: 145–147.
- [23] Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH. (1996) Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the MTHFR gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet*. 58: 35–41.
- [24] Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH. (2000) Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate-adequate persons homozygous for the C677T mutation in the MTHFR gene. *J Nutr*. 130: 2238–2242.
- [25] McCully KS. (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol*. 56: 111–128.
- [26] Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in MTHFR. *Nat Genet*. 10: 111–113.
- [27] Zintzaras E. (2005) The relationship between C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and retinopathy in type 2 diabetes: a meta-analysis. *J Hum Genet*. 50: 267–275.
- [28] Arnesen E, Refsum HM, Bona KH. (1995) Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol*. 24: 704–709.
- [29] Greene DA, Lattimer SA, Sima AAF. (1987) Sorbitol, phosphoinositides and sodium - potassium ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 3(6): 559–606.
- [30] Labovitz HE. (1998) Diagnostik and classification of diabetes mellitus. In: Lebovitz HE, Ed. Therapy for diabetes mellitus and related disorders. Amerikan Diabetes Association Clinical Education Series, Third Edition, Virginia, 4–7.
- [31] Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Zarzour W, Giesel J. (2003) Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the B-vitamins: a facet of nature-nurture interplay. *Clin Chem Lab Med*. 41: 547–553.
- [32] Molloy A, Daly S, Mills JL. (1997) Thermolabile variant of 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications to folate intake recommendations. *Lancet*. 349: 1591–1593.
- [33] Makiko M. (2003) MTHFR gene polymorphism as a risk factor for diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients without serum creatinin elevation. *Diabetes Care*. 26: 2–3.