

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**DİABETİK HASTALARDA GHRL (RS4684677), FTO
(RS8044769) VE PGC-1A (RS8192678) POLİMORFİZMLERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

OSMAN OĞUZ

**DANIŞMAN
PROF. DR. ARZU ERGEN**

**MOLEKÜLER TIP ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP**

İSTANBUL-2021

ÖZET

Oğuz, Osman. (2021). “Diabetik” Hastalarda “GHRL (rs4684677)”, “FTO (rs8044769)” Ve “PGC-1 α (rs8192678)” “Polimorfizmleri” Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp AD. Doktora Tezi. İstanbul.

“Diyabet”, pankreasın Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinde multifaktöryel sebeplere bağlı olarak insülin sentez defektleri sonucu gelişen genel olarak hiperglisemi ile kendini gösteren, kronik bir grup metabolik bozukluktur. “Diyabet” gelişiminde çevresel etkenlerin rolü olduğu kadar genetik yatkınlık da çok önemlidir. “Diabetik hastalarda” yapılan “polimorfizm” çalışmaları sonucu birçok gen diyabet gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Biz de çalışmamızda genel olarak “diyabet” ve “obezite” ile ilişkilendirilen “GHRL”, “FTO” ve “PGC-1 α ” genlerinin belirli varyantlarının diyabet ile ilişkisini hasta ve kontrol grupları üzerinden karşılaştırarak göstermeyi amaçladık. Çalışmamıza 100 “Tip2 DM” hasta ve 94 sağlıklı gönüllüler dahil edilmiştir. “GHRL (rs4684677)”, “FTO (rs8044769)” Ve “PGC-1 α (rs8192678)” gen polimorfizm çalışmaları DNA izolasyonu sonrası Real-Time PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları gösterebilmek için One-Way ANOVA testi, Post-Hoc ve Kruskal-Wallis testleri, SPSS kullanarak uygulandı. “GHRL (rs4684677)” için “hasta” ve kontrol grupları arasında fark bulunmazken, “FTO (rs8044769)” varyantı için “TT” allelini ve “PGC-1 α (rs8192678)” varyantı için “GG” allelini taşıyanlar, hasta grubunda daha sık olarak bulunmuştur. “FTO (rs8044769)” için hasta grubunda “TT genotipi” taşıyanlarda “CT” genotipi taşıyanlara göre LDL düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. “PGC-1 α (rs8192678)” için. “hasta” grubunda, glukoz ve BMI düzeyleri “GA genotipi taşıyanlarda” “GG genotipi taşıyanlara göre anlamlı olarak yüksek gözlemlenmiştir. “GHRL (rs4684677)” allellerinin biyokimyasal profillere göre dağılımında istatistiksel olarak bir farklılık saptanmamıştır. İlgili genlerin diyabet ile ilişkisi açıklama adına daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Ghrelin, Alfa-ketoglutarat bağımlı hidroksilaz FTO, Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama koaktivatör 1-alfa, Diyabetes Mellitus, Polimorfizm-Genetik.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32927

ABSTRACT

Oğuz, Osman. (2021). Investigation of The Relationship Between “GHRL (rs4684677)”, “FTO (rs8044769)” and “PGC-1 α (rs8192678)” “Polymorphisms” In Diabetic Patients. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Molecular Medicine. Doctoral Thesis. Istanbul.

“Diabetes” is a chronic group of “metabolic” disorders that generally presented with hyperglycemia as a result of insulin synthesis defects due to multifactorial causes in beta cells in the Langerhans islets of the pancreas. In the development of diabetes, genetic predisposition is as important as environmental factors. As a result of polymorphism studies in diabetic patients, many genes have been found to be associated with the development of diabetes. In our study, we aimed to represent the relationship between diabetes and certain variants of the GHRL, FTO and PGC-1 α genes, which are generally associated with diabetes and obesity, by comparing the patient and control groups. 100 Type 2 DM patients and 94 healthy volunteers were enrolled in our study. GHRL (rs4684677), FTO (rs8044769) and PGC-1 α (rs8192678) gene polymorphism studies were performed by Real-Time PCR method after DNA isolation. One Way ANOVA test, Post-Hoc and Kruskal-Wallis tests were applied using SPSS in order to show the statistical differences among two groups. The carriers of TT allele for the FTO (rs8044769) variant and the GG allele for the PGC-1 α (rs8192678) variant were found more frequently in the patient group, while the GHRL (rs4684677) did not differ between the patient and control groups. For PGC-1 α (rs8192678) variant in the patient group, glucose and BMI levels were observed to be significantly higher in carriers of the GA genotype than those with the GG genotype. There was no statistical difference in the distribution of GHRL (rs4684677) alleles according to biochemical profiles. Further studies are needed to explain the relationship of related genes with diabetes.

Key Words: Ghrelin, Alpha-Ketoglutarate-Dependent Dioxygenase FTO, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha, Diabetes Mellitus, Polymorphism, Genetic.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 32927

1. GİRİŞ VE AMAÇ

“Diyabetes Mellitus” (DM), pankreasın insülin hormon sentezi ve sekresyonunun veya hedef dokudaki insülin etkisinin bozulması nedeniyle ortaya çıkan ve kendini klinik olarak hiperglisemi, polidipsi, poliüri ve polifaji ile gösteren kronik metabolik bir hastalıktır (1).

“Tip 2 diyabet”, insülin salgılanma kusurlarına neden olabilecek inflamasyon ve metabolik stres gibi durumların yanı sıra genetik faktörlerin de dahil olduğu sistemik bir hastalıktır (2).

“Ghrelin”, ilk olarak 1999 yılında keşfedilen ve esas olarak midenin fundus bölümünde sentezlenen, “GHRL” geni tarafından kodlanan, 28-aminoasitli , polipeptid yapıda oreksijenik bir hormondur. İnsanlarda ,iştahı arttırıcı, Growth Hormon üzerinden büyümeyi tetikleyici ve enerji metabolizmasını düzenleyici etkileri vardır. Ayrıca “GHRL” genindeki tek nükleotidlik polimorfizmlerin (SNPs), metabolik sendrom, obezite ve “Tip 2 Diyabet” gelişimi ile ilgili olabileceği belirtilmiştir (3,4).

İnsan “FTO” geni, 16. Kromozomda yer alır ve yağ doku ve obezite ile ilişkili proteini (alfa-ketoglutarat bağımlı bir dioksijenaz) kodlar. “FTO” gen ekspresyonu, gıda alımının düzenlenmesi ve enerji dengesi ile ilişkilidir. “FTO” geninde meydana gelen SNP’ler atmış vücut kitle indeksi (BMI), obezite gibi metabolik düzeyde durum değişiklikleri ile birlikte psikiyatrik rahatsızlıklar, öğrenme ve hafıza, alkol ve sigara tüketimine yatkınlık, nöroenez, göğüs ve prostat kanseri, Alzheimer ve kardiyovasküler hastalık gibi obezite ilişkisiz durumlar ile de ilişkili bulunmuştur (5,6,7).

Peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama -1 α (PGC-1 α), PPARGC1A geni tarafından kodlanan ve hücrel enerji metabolizmasının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. “PGC-1 α ”, “obezite”, “diyabet” ve kardiyomiyopati patogenezlerinde rol

almaktadır ve bu durumların tedavisinde farmakolojik açıdan hedef olarak görülmektedir (8). Ayrıca mitokondrial biogenezi de düzenlediği için bu genin ekspresyonunun invaziv kanserler gelişimi ve uzak metastaz riskini arttırmasıyla da ilişkili bulunmuştur (9).

Son dönemde yapılan çalışmalarda “Tip 2 diyabette” de genetik yatkınlık olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmanın temel amacı, karbonhidrat ve lipid metabolizmalarında görev aldığı bilinen “GHRL”, “FTO” ve “PGC-1 α ” genlerinde görülebilen belirli polimorfizimlerin diyabet tanısı konmuş hastalardaki sıklıklarının ve lipid profilleri üzerine olan etkilerinin incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabetes Mellitus

2.1.1. Diyabetes Mellitus Tanımı ve Klinik Belirtileri

“Diyabetes mellitus”, insülin sekresyonunun bozulması, hedef dokuda etkisinin azalması veya her ikisinin birden gerçekleşmesi nedeniyle hipergliseminin varlığı ile karakterize heterojen bir metabolik bozukluktur. “Diyabetin” kronik hiperglisemisi, gözleri, böbrekleri ve sinirleri etkileyen nispeten spesifik uzun süreli mikrovasküler komplikasyonların yanı sıra artmış kardiyovasküler hastalık riski ile ilişkilidir (10). “Diyabetin” klinik belirtileri arasında poliüri, polidipsi, polifaji veya iştahsızlık, açıklanamayan kilo kaybı, ağız kuruluğu, halsizlik, çabuk yorulma, bulanık görme, karıncalanma, uyuşukluk, inatçı enfeksiyonlar ve tekrarlayan mantar enfeksiyonları bulunmaktadır (1).

“Diyabetik hastalarda” ortaya çıkan ve en önemli mortalite sebebi olan kardiyovasküler hastalıkların gelişmesinde “diyabete” eşlik eden hiperlipidemi ve hipertansiyon önemli rol almaktadırlar. “Diyabetik hastalıklara” dislipidemi sıklıkla eşlik etmektedir. Bu kişilerde serum trigliserid seviyeleri yüksek, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL-Kolesterol) düşük ve aterosjenik etkileri olan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL-Kolesterol) seviyeleri yüksek seyretmektedir (11). “Diyabetik kişilerde”, kronik hiperglisemiye bağlı olarak gelişen mikrovasküler ve makrovasküler değişiklikler sonrası serebrovasküler inme gerçekleşme riski diyabet olmayan kontrol grubuna göre 2-4 kat yüksekken, kardiyovasküler inme geçirme riski ise 5 kat daha fazladır (12).

“Diyabetik hastalarda” akut ve kronik olacak şekilde bir takım komplikasyonlar gelişebilmektedir. Akut komplikasyonlar arasında ketoasidoz, hiperosmolar hiperglisemik sendrom, laktik asidoz, hipoglisemi ve bakteriyel enfeksiyonlar bulunmaktadır (13). Kronik komplikasyonlar ise mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Retinopati, nefropati ve nöropati diyabetin mikrovasküler komplikasyonları arasında yer almaktadır. Diyabetik ayak, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı, serebrovasküler atak, seksüel ve gastrointestinal bozukluklar ise diyabetin makrovasküler komplikasyonları arasında yer almaktadır (14).

2.1.2. “Diyabetin” Sınıflandırılması

“Diyabetik hastaların” büyük çoğunluğu etyopatogenetik olarak iki büyük gruba ayrılırlar. Birinci grup mutlak ya da mutlağa yakın insülin sekresyon eksikliği görülen Tip 1 diyabettir. Bu gruptaki hastalar, pankreasın Langerhans adacık Beta hücrelerinde gerçekleşen oto-immün patolojik sürecin serolojik yöntemlerle ya da genetik belirteçlerle ortaya konulması ile tespit edilebilir. Çok daha yaygın olan bir diğer kategori ise “Tip 2 diyabettir”. Buradaki sorun ise “insüline” karşı hedef hücrede direnç ve/veya “insülinin” salgı mekanizmalarının yetersiz kompensatuar yanıtıdır. Bunlara ek olarak, hamilelikleri sırasında diyabet gelişen kadınlar gestasyonel diyabetli olarak sınıflandırılır. Ayrıca, enfeksiyonlar, ilaçlar, endokrinopatiler, pankreas yıkımı ve genetik kusurların neden olduğu diyabet türleri de vardır (15).

Tablo 1: Diyabet Sınıflandırılması (15)

I.	Tip 1 diyabet (β hücre yıkımı ile birlikte)
	A. İmmün aracılı yıkım
	B. İdiyopatik
II.	Tip 2 diyabet (İnsülin direnci ya da insülin sekresyon defektleri)
III.	Diğer özellikli tipler
	A. β hücre fonksiyonlarının genetik defektleri
	1. MODY 3 (Kromozom 12, HNF-1a)
	2. MODY 1 (Kromozom 20, HNF-4a)
	3. MODY 2 (Kromozom 7, glukokinaz)
	4. MODY'nin diğer nadir formları (MODY 4: Kromozom 13, insulin promoter factor-1; MODY 6: Kromozom 2, NeuroD1; MODY 7: Kromozom 9, karboksil ester lipaz)
	5. Geçici yenidoğan diyabeti (Yaygın olarak 6q24 anomalisine bağlı olarak ZAC/HYAMI gen defektleri)
	6. Kalıcı yenidoğan diyabeti (Yaygın olarak β -hücre K_{ATP} kanalının KIR6.2 alt ünitesini kodlayan KCNJ11 geninin kodlama defektleri)
	7. Mitokondriyal DNA
	8. Diğerleri

B. İnsülin etkisindeki genetik defektler

1. Tip A insülin direnci
2. Leprechaunism
3. Rabson-Mendenhall Sendromu
4. Lipoatrofik diyabet
5. Diğerleri

C. Ekzokrin Pankreas Hastalıkları

1. Pankreatit
2. Travma/pankreatektomi
3. Neoplaziler
4. Kistik Fibrozis
5. Hemokromatozis
6. Fibro-kalküloz Pankreopati
7. Diğerleri

D. Endokrinopatiler

1. Akromegali
2. Cushing Sendromu
3. Glukagonoma
4. Feokromasitoma
5. Hipertiroidizm

6. Somatostatinoma

7. Aldosteranoma

8. Diğerleri

E. İlaç veya Kimyasallara Bağlı

1. Vacor

2. Pentamidine

3. Nikotinik Asit

4. Glukokortikoidler

5. Tiroid Hormonları

6. Diazoksit

7. B-Adrenerjik agonistler

8. Tiyazid

9. Dilantin

10. γ - interferon

11. Diğerleri

F. Enfeksiyonlar

1. Konjenital Rubella

2. CMV

3. Diğerleri

G. İmmün sistem ile ilişkili yaygın-olmayan formlar

1. Stiff-man sendromu
2. Anti-insülin reseptör antikorları
3. Diğerleri

H. Bazen diyabet geliştirebilen diğer genetik sendromlar

1. Down Sendromu
2. Klinefelter Sendromu
3. Turner Sendromu
4. Wolfram Sendromu
5. Friedreich ataksisi
6. Huntington koresi
7. Laurence-Moon-Biedl sendromu
8. Miyotonik distrofi
9. Porfiria
10. Prader-Willi Sendromu
11. Diğerleri

IV. Gestasyonel Diyabet

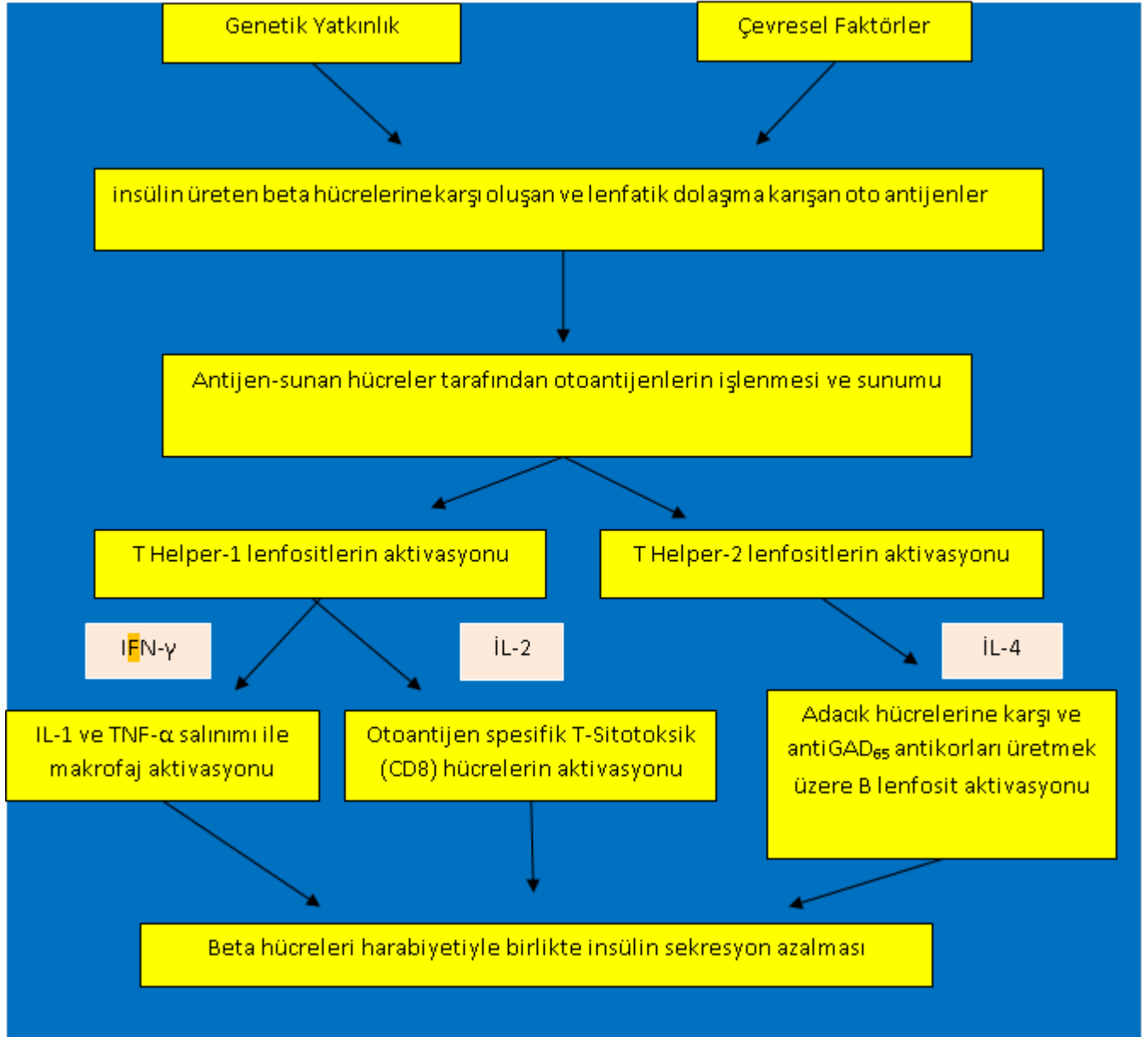
2.1.2.1. “Tip 1 Diyabet”

“Tip 1 diyabet”, daha önce insüline bağımlı veya genç başlangıçlı diyabet olarak adlandırılıyordu. Pankreas’ın Langerhans adacıklarında yer alan beta hücrelerin hasarı

sonucu oluşan insülin üretim eksiklikleri ve hiperglisemi ile karakterize kronik otoimmün bir hastalıktır. “Tip 1 diyabet”, çocuklarda ve ergenlerdeki tüm diyabet vakalarının % 5-10'unu oluşturmaktadır. Hastalarda insülin eksikliği sebebiyle insülin aracılı glukoz alım mekanizmasında meydana gelen aksaklıklar sonucunda hücre içine glukoz alımı gerçekteşmez. Bu, aşırı derecede yüksek kan şekeri seviyelerine ve yaşamı tehdit edebilen diyabetik ketoasidoz durumlarına sebep olabilir. Hücre içine giremeyen ve dolaşımda bulunan yüksek glukoz, ketoasidoz, nöropati, retinopati, nefropati, kalp hastalığı, felç, körlük ve amputasyonlar gibi çeşitli komplikasyonlara yol açar (16,17).

“İnsülinin” hedef dokudaki azalmış fonksiyonu, hem insülin duyarlılığının azalmasını hem de insülinin yüksek şeker seviyelerine tepkisinin azalmasını kapsar. Azalmış İnsülin duyarlılığı ise insülin konsantrasyonuna maksimum yanıtı ortaya çıkarmak için daha yüksek insülin konsantrasyonuna ihtiyaç olduğu şeklinde açıklanabilir. Bu durum genel olarak insülin direnci olarak tanımlanır (18).

“ Tip 1 diyabet”’in patofizyolojisi Şekil 1’de kısaca özetlenmiştir (19).



Şekil 1:Tip 1 Diyabet patofizyolojisi (19)

“Tip 1 diyabetin” patogenezi genellikle bağışıklık sisteminin pankreas hücrelerine karşı saldırısını içeren otoimmün bir süreci içerir. Langerhans hücrelerinin adacıklarına karşı antikorlar, çoğu “Tip 1 diyabet” hastasının tanı anında mevcuttur.

“Tip 1 diyabette” meydana gelen değişiklikler, yeterli insülin salınımının gerçekleşmediği veya mevcut insülinin fonksiyonel olamadığı durumlarda gerçekleşir (20). “Tip 1 diyabet” geliştirme riski yüksek olan bireyler genetik belirteçler ve karakteristik otoantikorların mevcudiyeti ile tanımlanabilir. Adacık hücresi otoantikorları başta olmak üzere insülin, glutamik asit dekarboksilaz veya tirozin fosfataz IA-2 ve IA-2 β ve ZnT8'e karşı oluşan otoantikorlar genellikle mevcuttur. Doğum esnasında HLA bölgesindeki genetik varyasyonlar ise ileride diyabet riskini göstermesi açısından faydalıdır. HLA DR4-DQ8’li çocuklarda insülin oto-antikorları ve DR3-DQ2’li çocuklarda ise GAD antikorlarının gösterilmesi sayesinde bu tarz oto-antikorların oluşumunun tetiklenmesi genetik etkenlerin yanında çevresel etkenlerin de olabileceği söylenmektedir (21).

1986’da Eisenbarth tarafından öne sürülen doğrusal beta hücre azalışı hipotezi, “Tip 1 diyabet” için başvurulmuş en yaygın model olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, bazı yazarlar, “Tip 1 diyabet”deki hastalığın ilerlemesinin doğrusal bir süreç olmadığını, daha ziyade bireysel hastalarda değişken bir hızda ilerlediğini iddia etmektedir. Bu anlayışa göre “Tip 1 diyabet” “tekrarlayan-geri çekilen” bir hastalıktır; Beta hücre kütleindeki dalgalanmalar, düzenleyici unsurları ve otoreaktif hücreleri içeren karmaşık bir dizi olaydan kaynaklanan beta hücre yıkımı dalgalanmalarının bir sonucu olarak zamanla meydana gelir. Yaşlanma, diyet, bağışıklık, mikrobiyal patojenler, mikrobiyomlar ve epigenetik değişiklikler gibi β hücrelerini yok eden bağışıklık sistemini modüle eden karmaşık faktörlerin etkisi, hala tam olarak anlaşılmamıştır. Hastalığın geri çekilme döneminde düzenleyici sitokinlerin üretiminin artması tedavisinde terapötik olarak kullanılabilecek antijen-antikor komponentini de olduğunu göstermektedir (22,23).

2.1.2.2. Tip 2 Diyabet

Dünyadaki yetişkinlerin % 9'unun -450 milyon insan- “diyabet hastası” olduğu ve büyük bir çoğunluğunun da daha teşhis almadığı düşünülünce 2040 yılı itibariyle diyabetli hasta sayısının 642 milyon kişiye çıkacağı tahmin edilmektedir. Ölüm, morbitide, ve başka hastalıklara neden olabilen diyabet şimdi de küresel olarak halk sağlığını tehdit etmektedir. “Tip 2 diyabet” ise tüm diyabet vakalarının %87-91 ‘ini oluşturmaktadır (24).

“Tip 1 diyabet”, genel olarak hormonlara veya hücrelere karşı oluşan otoantikorlarının varlığı ile karakterize edilirken, “tip 2 diyabet” ise periferik insülin direnci ve pankreas beta hücreleri tarafından işlevsiz insülin salgılanmasının bir kombinasyonu olarak tanımlanır. “Tip 2 diyabet” gelişimi için başlıca risk faktörleri arasında yaş, aile öyküsü, etnik köken, obezite, dislipidemi, visseral yağlanma ve sedanter yaşam gösterilebilir. Aile öyküsü ise “Tip 2 diyabet” gelişiminin önemli bir belirleyicisidir (19,25).

İnsülin direnci, bir hedef hücrenin insüline metabolik yanıtında azalma veya tüm organizma düzeyinde enjekte edilen veya sentezlenen insülinin kan glukoz seviyelerini düşürmeye etki edememesi şeklinde tanımlanabilir. İnsülinin fonksiyonunun azalması ,bir transkripsiyon faktörü olan ve glukoneogenezi hızlandıran FOXO1’in karaciğerde aktivasyonuna ve glukozu hücre içine taşıyan transport proteinlerinin (GLUT4) azalmasına neden olur. İnsülin direnci gelişen kişilerde aminoasit, glukoz ve lipid metabolizmaları içeren yollarda aksaklıklar gelişmesi olasıdır. Bu form “Tip 1 diyabete” birçok yönden benzemesine ragmen, var olan insülin sayesinde karaciğerin

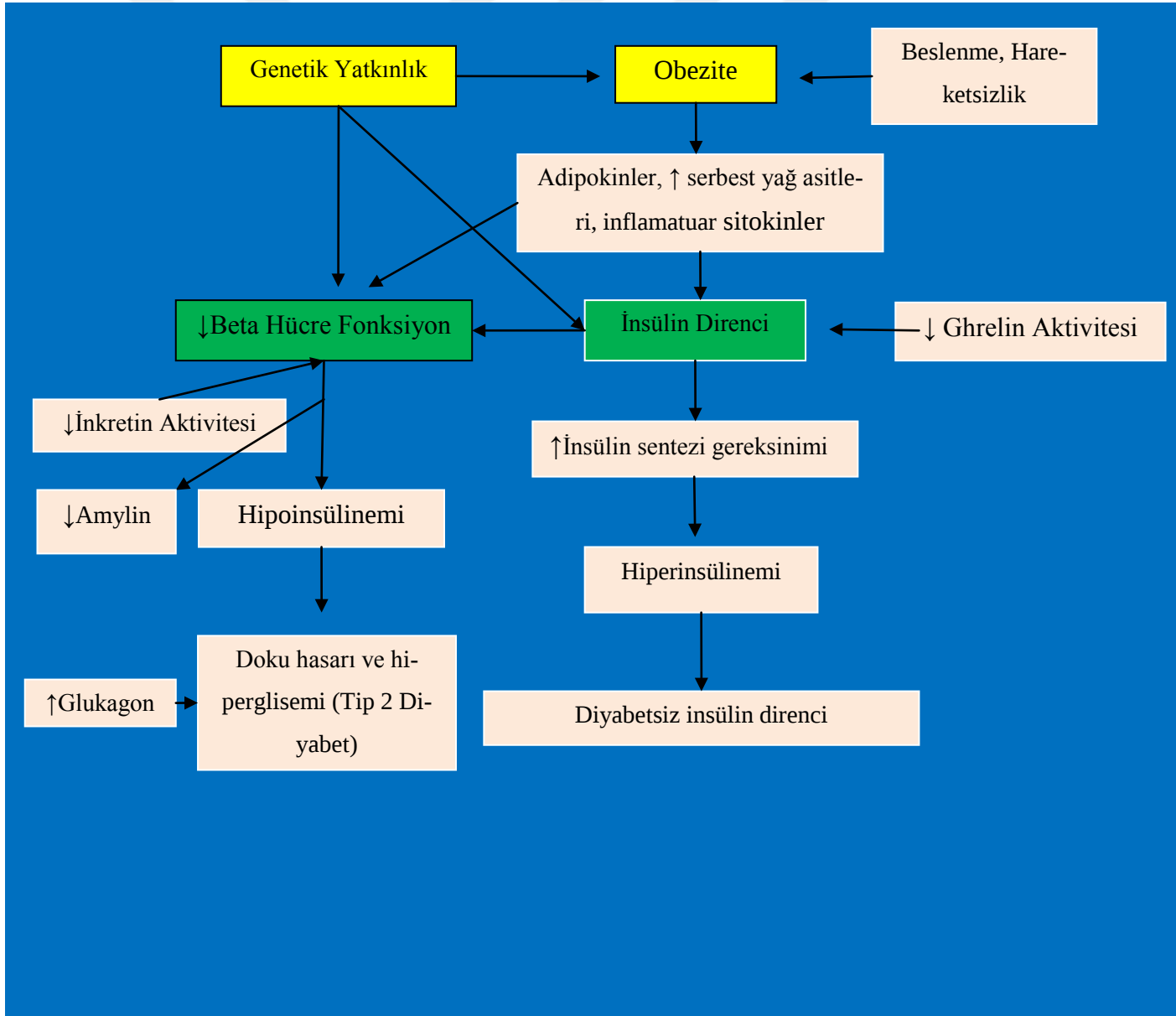
hala glikojen üretebilmesi ve lipolizi kontrolü bakımından farklılıklar gösterir. Yetersiz beslenme ve obeziteye bağlı olarak plazma lipoproteinleri genellikle yüksek seyredir. Ketoasidoz genellikle “tip 2 diyabetle” ilişkilendirilmese de metabolik stress faktörleri ve pankreas yetmezliğiyle birlikte insülin üretiminin ve sekresyonunun azalmasını takiben ortaya çıkabilir (19,26).

“Tip 2 Diyabet” gelişimi bir takım yaşam tarzı faktörleri ve de genetik yatkınlık ile yakından ilişkilidir. Etnik köken, artmış BMI, beslenme şekli, sedanter yaşam tarzı, fiziksel aktivite ve egzersiz azlığı, sosyo-ekonomik durumlar, sigara ve alkol tüketimi gibi birçok alışkanlık “Tip 2 diyabet” gelişiminde büyük öneme sahiptir (27).

Diyet, “Tip 2 diyabet” için değiştirebilir bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Beslenme tercihleri, özellikle kaçınılmaz olarak yaşanan ve daha hareketsiz toplumlarda “insülin direncinin” temel bir faktörüdür. Hazır yiyecekler , etler ve diğer hayvansal yağlar, yüksek oranda rafine edilmiş tahıllar ve şekerle tatlandırılmış içecekler dahil olmak üzere kalorisi yoğun gıdaların tüketimindeki artışların, dünya çapında “tip 2 diyabet” oranlarının yükselmesinde kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir. Total ve doymuş yağ alımı, vücut kitle indeksinden bağımsız olarak artmış “Tip 2 diyabet” riski ile ilişkilidir. Vejetaryen tarz beslenme, kepekli tahıllar, sebze,meyve, kuruyemiş tüketimi ve hayvansal gıdalardan uzak beslenme “Tip 2 diyabet” gelişimi için koruyucu etkiye sahiptir ve obezite, hipertansiyon, hiperlipidemi, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser görülme sıklığını azaltmaktadır. Aynı şekilde yüksek oranda linoelik asit alımının da koruyucu etkisi bulunmaktadır. (28,29).

“Tip 2 diyabet” patogenezinde temel olarak “insülin direnci” ve sekresyonundaki bozukluklar rol oynamaktadır. Hedef dokudaki “insülin direnci” özellikle karaciğer ve çizgili kaslara, glukoz girmesini engelleyerek ve ihtiyacı olan

glukozu sentezleyebilmesi için glukoneogenezi teşvik etmesi sonucu plazma glukoz seviyelerinde yükseklik görülür. Ayrıca bu direnç yağ dokularında hormona duyarlı lipazın aktivasyonuna engel olur. Böylelikle adipositlerde aşırı derecede trigliserit yıkılımına ve dolaşıma çıkan serbest yağ asidi miktarında artışa neden olur. “Tip 2 Diyabet” patogenezi şekil 2’de kısaca özetlenmiştir (19,30).



Şekil 2:Tip 2 Diyabet Patogenezi (19)

2.1.3. Diyabetin tanı kriterleri

“Diyabet”, genel olarak 75 g oral glukoz tolerans testi (OGTT) uygulaması sırasında 2. Saat glukoz değeri, açlık kan şekeri (AKŞ) değeri veya HbA_{1c} değerlerine göre teşhis edilebilir. Genel olarak, AKŞ, 75 g OGTT uygulaması 2. Saat glukoz değeri ve HbA_{1c} testleri diyabet tanısı koyarken eşit derece uyumludur (2).

Tablo 2:Diyabet Tanı Kriterleri (2)

AKŞ $\geq$ 126 mg/dL (7.0 mmol/L). Açlık durumu için 8 saat kalori alımı olmamalıdır
Ya da
75-g OGTT sırasında 2. Saat glukozu $\geq$ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)
Ya da
A1C $\geq$ 6.5% (48 mmol/mol)
Ya da
Hiperglisemik sendromları olan ve rastgele glukoz değeri $\geq$ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)

“Prediyabet”, “HbA_{1c}” ve “Glukoz” gibi glisemik belirteçleri normalin üzerinde olan fakat diyabet tanı kriterlerinin altında olan bir ara form hiperglisemi durumudur. “Prediyabet” kendi başına bir hastalık durumu olarak görülmemekle birlikte “diyabet”,

nöropati, nefropati, retinopati ve kardiyovasküler hastalık gelişimi için artmış risk olduğunu göstermektedir. “Prediyabet”, obezite (özellikle abdominal veya visseral obezite), yüksek trigliserit ve/veya düşük HDL-kolesterol seviyeli dislipidemi ve hipertansiyon ile ilişkilidir. “Prediyabetik hastalarda” bozulmuş glukoz toleransı (IGT) ve/veya bozulmuş açlık glukozu (IFG) ve/veya A1C 5.7–6.4% (39–47 mmol/mol) gözlenir. “Prediyabet” kendi başına bir hastalık durumu olarak görülmemekle birlikte diyabet ve kardiyovasküler hastalık gelişimi için artmış risk olduğunu göstermektedir. “Prediyabet”, obezite (özellikle abdominal veya visseral obezite), yüksek trigliserit ve/veya düşük HDL-kolesterol seviyeli dislipidemi ve hipertansiyon ile ilişkilidir (2,31).

Tablo 3: Prediyabet Kriterleri (2)

AKŞ: 100 mg/dL (5.6 mmol/L) - 125 mg/dL (6.9 mmol/L) (IFG)
Ya da
75-g OGTT esnasında 2. Saat glukoz değeri 140 mg/dL (7.8 mmol/L)- 199 mg/dL (11.0 mmol/L) (IGT)
Ya da
A1C 5.7–6.4% (39–47 mmol/mol)

2.1.4. Tip 2 Diyabet ve genetik yatkınlık

“Tip 2 diyabet” genel olarak kompleks multifaktöryel poligenik bir hastalıktır. Hastalık gelişimi çevresel faktörleri de içine alan çok farklı genin birbirleriyle etkileşimleriyle gerçekleşir. İkizler ve aynı aile ait bireyler üzerinde yapılan çalışmalar “Tip 2 diyabet”nin kalıtsallığının, diyabet başlangıç yaşına ve vakaların glisemik durumuna bağlı olarak % 30 ila % 70 arasında değiştiğini göstermiştir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları “(GWAS)” da dahil olmak üzere birçok çalışma “Tip 2 diyabetin” poligenik yapısını ve ilgili genlerin lokalizasyonlarını göstermişlerdir (32).

Enerjinin ısıya dönüşümünü sağlayan, yağ metabolizmasını ve termogenezi kontrol eden bir proteini kodlayan Beta-3 adrenoreseptör geni, 8. kromozomun kısa kolunda bulunur. TRP64ARG adlı belirli bir mutasyon, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki beyaz ırk kökenli olan Pima Kızılderililerinde gözlemlenir ve bu kabilede “tip 2 diyabet” gelişme riski diğer yüksek risk gruplarına kıyasla yaklaşık dört kat daha fazladır. Bu mutasyon Triptofan yerine Arginin değişimini içeren tek aminoasit mutasyonudur ve yağ dokusunda lipolizi arttırırken kas dokusunda termojenezin azaltılmasına neden olur. Ayrıca bu mutasyon obez ve yüksek riskli alt gruplarda artmış insülin direnci ile ilişkilidir (33).

“GWAS” çalışmaları, dünya genelindeki farklı etnik topluluklardaki risk içeren varyantlarının sayısı, sıklığı ve etki boyutları dahil olmak üzere “Tip 2 diyabet”in genetik yapısına ilişkin tahminler ve öngörüler sağlamaktadır. Bu çalışmalarla, “Tip 2 diyabet”in poligenik yapısı ortaya çıkmış ve bazı lokuslarda çok sayıda riskli varyantların tanımlanmış ve allelik heterojenitenin gösterilmesi sağlanmıştır. Bu çalışmalarla birlikte, MODY (Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet) ve neonatal diyabet formları ile ilgili birçok gen ve varyant monojenik olarak hem monojenik hem

de poligenik diyabette ise en az beş genin rol aldığı tespit edilmiştir. “Tip 2 diyabetle” birlikte sıklıkla görülebilen metabolik sendromla 56 lokus, lipidlerle ilgili 157 lokus ve hipertansiyonla ilgili 90 ‘dan fazla lokus tespit edilmiştir (34,35).

“Tip 2 diyabetle” ilişkilendirilen ilk genetik varyant,peroksizomal proliferatörle aktive edilmiş reseptör gama genindeki (PPARG) P12A polimorfizmi (rs1801282) oldu. Daha sonra, 2003 yılında, büyük ölçekli bir çalışmada, içeri doğru rektifiye potasyum kanalları alt ailesi J, üye 11 kodlayan gende (KCNJ11) E23K (rs5219) polimorfizmi ve Tip 2 diyabet arasında ilişki saptandı. 2007 yılında ise GWAS çalışmalarıyla 3 yeni genin belirli varyantlarının Tip 2 diyabet ile ilişkili bulundu (SLC30A8, HHEX, ALX4). Çalışmalar günümüzde halen devam etmektedir (36).

“Tip 2 diyabet” gelişiminde rol alan aday genler Tablo 4’de kısaca özetlenmiştir (13).

Tablo 4:Tip 2 diyabetle ilişkili aday genler ve genetik polimorfizmler (37)

Gen	Kodlanan Protein	Protein’in Görevi	Diyabet ilişkili allel	Varsayılan mekanizma
PPARG	Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör Gama	Nükleer Reseptör	1.25	Adipoz doku ilişkili inüslin direnci
KCNJ11	İçe doğrultucu	Potasyum Kanalı	1.12	B-hücre

	potasyum kanalı 6.2			disfonksiyonu
WFS1	Wolframin	Endoplazmik Retikulum Stress yolak aktivasyonu	1.19	B-hücre Apoptozisi
HNF1B	Transkripsiyon Faktör 2	Transkripsiyon Faktörü	1.12	B-hücre disfonksiyonu
TCF7L2	Transkripsiyon faktörü 7 benzeri 2	Wnt sinyal ileti	1.40	İnsülin,glukagon sentezi
SLC30A8	Membran Taşıyıcı aile 30, üye 8	B-hücre içinde çinko taşıyıcı	1.12	B-hücre disfonksiyonu
FTO	Yağ doku ve obezite ile ilişkili geni proteini	2-oxoglutarate-bağımlı nükleik asit demetilaz	1.23	Obezite
HHEX	Hematopoietik olarak eksprese edilen insülin parçalayan	..	1.14	Pankreas-Karaciğer gelişimi, İnsülin aktivasyonu

enzim					
CDKN2A/2B	Siklin-bağımlı kinaz inhibitor 2A/2B	Hücre döngüsü fonksiyonu	1.20		B-hücre disfonksiyonu
IGF2BP2	İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 mRNA bağlayıcı protein 2	IGF2 mRNA Transportu	1.17		B-hücre fonksiyonu
CDKAL1	CDK5-düzenleyici bir alt birim-ile ilişkili protein 1-benzeri 1	Rejenerasyon	1.12		B-hücre gelişimi
JAZF1	Başka bir çinko parmak proteini 1 ile yan yana yerleştirilmiş	NR2C2 baskılayıcısının kodlayıcısı	1.10		Büyüme baskılayıcı
CDC123/CAMK1D	kalsiyum ya da kalmodulin-bağımlı protein kinaz D	Muhtemelen hücre döngüsü regulasyonu	1.11		Hücre döngüsü baskılaması

TSPAN8	Tetraspanin 8	Hücre-yüzey glikoproteini	1.09	Bilinmiyor
THADA	Tiroid adenom ilişkili gen	Apoptoza dahil	1.15	Bilinmiyor
ADAMTS9	Trombospondin motifleri 9 olan bir disintegrin ve metaloproteinaz	Proteoglikanların yarılması	1.09	Bilinmiyor
NOTCH2	Notch homolog 2	Embriyonik pankreatik kanal hücrelerinin transmembran reseptörleri	1.13	B-hücre disfonksiyonu

2.1.4.1. GHRL Geni

“İnsan Ghrelin” geni 3 numaralı kromozomda p25-26 bölgesinde lokalize durumdayken, reseptörleri ise aynı şekilde 3 numaralı kromozomda q26-27 bölgesinde lokalizedir. “İnsan ghrelin” geni dört eksondan oluşmuştur. Yalnızca 20 baz çifti içeren başka bir kısa ekson ise, “ghrelin” mRNA'sının küçük bir bileşeni olarak yer alan 5' – çevrilmemiş bölgeyi kodlar (38).

“İnsan ghrelin” geninin 5’-komşu bölgesi, TATA kutusu benzeri bir dizi (TATATAA; –585 to –579), aynı zamanda AP2, basic helix-loop-helix (bHLH), PEA-3, Myb, NF-IL6, hepatosit nukleer faktor-5 ve NF-(kappa)B gibi bir takım transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgesi içerir (38).

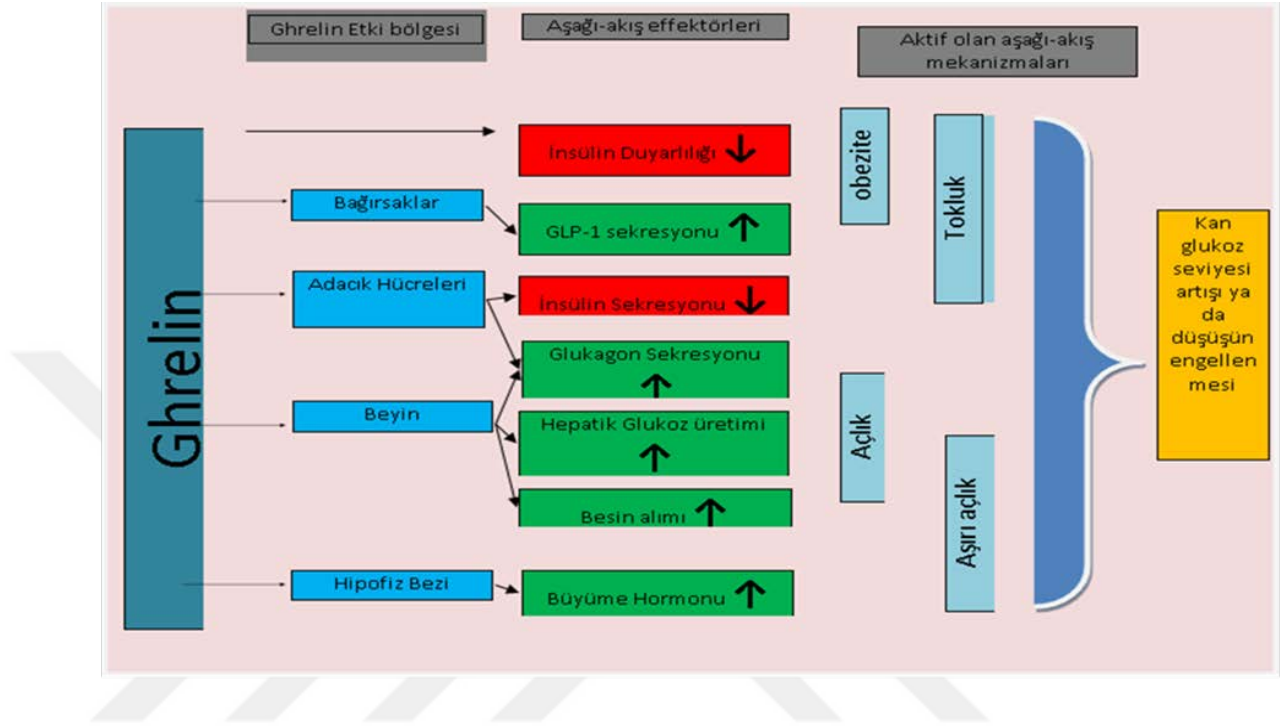
“İnsan Ghrelin geninin” ekzon 1-4 bölgeleri, 117 amino asit içeren ve preprohormon olan preproghrelini kodlar. Preproghrelin sinyal peptidi, ekson 1 tarafından kodlanırken , fonksiyonel ghrelin peptidinin yirmi sekiz amino asidi, ekson 1 ve 2 tarafından kodlanır. C-ghrelin olarak adlandırılan preproghrelinin C-terminal bölgesi, geri kalan ekzonlar tarafından kodlanır ve 66 amino asitli bir peptittir. C-“Ghrelin” 23 amino asit içeren ve biyoaktif bir peptid olan Obestatin’i de içerir (39).

“Ghrelin” mRNA’sı, mide dokusunda güçlü bir şekilde eksprese edilirken bağırsak, pankreas, böbrekler ve plasenta da düşük seviyelerde bulunur. “Ghrelin” üreten hücreler, X-A benzeri hücreler olarak adlandırılır, boyundan midenin fundus bölgesindeki oksintik bezlere kadar olan bölgede bulunur. X/A benzeri hücreler, oksintik bezlerdeki endokrin hücre popülasyonunun % 20'sini oluşturan, yuvarlak, kompakt, ghrelin ile dolu olan granüler hücrelerdir (40).

“Ghrelin’in”, gıda alımı ve enerji metabolizmasının düzenlenmesi, mide asidi sekresyonunun uyarılması, pankreasın hareketliliği ve protein çıkışı, kardiyovasküler fonksiyonun modülasyonu, osteoblast aktivasyonu ve kemik oluşumunun uyarılması, nörojenez ve miyogenezin uyarılması, öğrenme ve hafıza, timopoez, uyku / uyanma ritmi, yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklarda nöroprotektif olarak rol alma gibi birçok aktif fonksiyonu bulunmaktadır (41).

Dokulardan sekrete edilen bazı faktörler doku homeostaz bozarak sistemik homeostaz'ın bozulmasına yol açabilirler. “Ghrelin” ve TNF- α , İL-6, İL-1 ve MCP gibi diğer faktörler, metabolizmanın ve inflamasyonun çeşitli yönlerin etki ederek insülin direncinin artmasına ve/veya metabolik sendroma neden olur. Obezitenin aracılık ettiği metabolik bozukluklar, çeşitli sitokinlerin ve kemokinlerin düzeylerini artırabilirler. Bu durum da inflamasyona bağlı insülin direncinin gelişimi için potansiyel bir risk faktörü olarak proinflamatuvar bir durumdur (42).

“Ghrelin”’in glukoz metabolizması üzerine olan etkileri hakkındaki ilk görüşler yapılan çalışmalar ışığı altında kan glukoz seviyelerini yükselttiği yönündeydi. Daha sonra yapılan çalışmalarla birlikte “ghrelin”’in kan glukozunu yükseltmekle birlikte glukoz toleransını da bozduğu gözlemlendi. Mevcut çalışmalar ise “ghrelin” ve insülin seviyeleri arasında negatif bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Yüksek kan glukozunun, ghrelin sekresyonunu baskılama ve insülin sentezini artırma şeklinde ghrelin ve insülin üzerine etkisi bulunmaktadır. Aynı zamanda ghrelin, insülin’in in-vitro glikojen sentezi ve glukoneogenez üzerindeki etkilerini inhibe etmektedir. “Ghrelin” ayrıca insülin duyarlılaştırıcı protein adiponektinin adipositlerden salgılanmasını inhibe eder ve GH, kortizol, epinefrin ve glukagon dahil olmak üzere karşı düzenleyici hormonların salgılanmasını uyarabilir (41,43). “Ghrelin”’in glukoz dengesi üzerine etkileri şekil 3’de özetlenmiştir (43).



Şekil 3:Ghrelin'in Glukoz Homeostazı üzerine etkisi (43)

Bugüne kadar, Leu72Met (rs696217), Arg51Gln ve Gln90Leu (rs4684677) dahil olmak üzere “GHRL” geninin birkaç tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) tanımlanmıştır. En yaygın varyant olan Leu72Met (rs696217), “Ghrelin geninin” “ghrelin” ve obestatin’i kodladığı ikinci eksonundaki değişiklik olarak tanımlanmıştır ve obezite, “insülin direnci” ve metabolik sendrom ile ilişkilendirilmiştir. Leu72Met mutasyonu, olgun ghrelin ürününün kodlandığı bölgenin dışında yer alır ve diziyi değiştirmez fakat fonksiyonel ghrelinin işlevini değiştirir (44).

Pre-pro-Ghrlin sentezi sırasında gerçekleşen 269A > T tek nükleotit değişimi şeklindeki mutasyon, Gln90Leu olarak adlandırılır ve Alzheimer ile ilişkilendirilmiştir.

Ayrıca Rs4684667 A/T varyantı da bilinçsel düzeydeki değişikliklerle, panik bozuklukları, metabolik sendrom, kanserler ve oto-immün tiroid hastalıklarıyla bağlantılıdır (45).

2.1.4.2. Yağ Kütlesi ve Obezite ile ilişkili Gen (FTO geni)

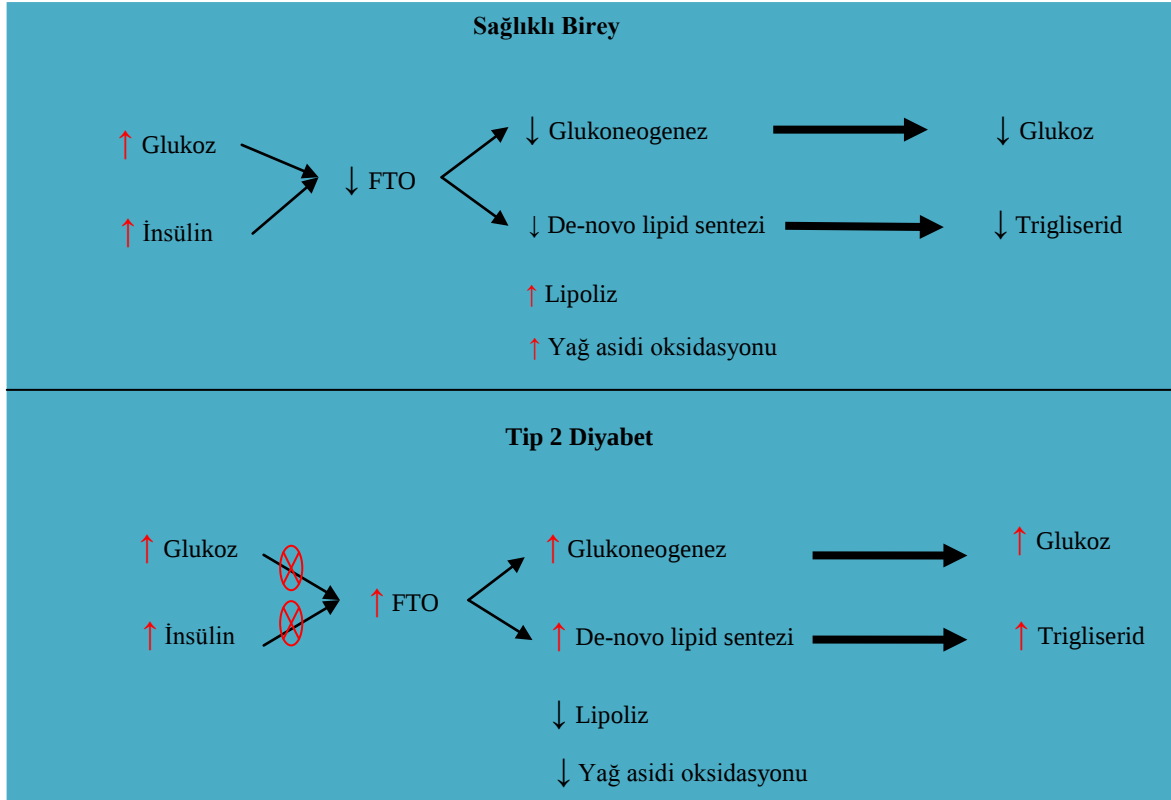
FTO geni, 16. Kromozom'un uzun kolunda (16q12.2) bulunur ve 2-oksoglutarat ve demir-bağımlı nükleik asit demetilaz enzim aktivitesine sahip bir proteini kodlar. FTO geni 410.50 kb uzunluğunda 9 ekzon ve 8 intron içeren bir gendir. FTO, yağ dokularında ve iskelet kaslarında yoğun bir şekilde eksprese edilir. Ayrıca hipotalamusta enerji dengesini kontrol eden arkuat çekirdekte de yoğun şekilde bulunması iştah ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde kritik bir rol oynayabileceğini gösterir (46).

FTO geninin kodladığı protein, demetilaz aktivitesini tek sarmallı N6-metiladenozin (m6A) RNA ve N6-metildeoksiadenozine (6mA) DNA üzerine uygular. m6A, RNA'larda en yaygın geri-dönüşümlü ve dinamik kimyasal modifikasyonlar olarak kabul edilir. mRNA stabilitesi, alternatif splicing ve mrna translasyonlarını düzenler. Bu modifikasyonlar tüm ekzon boyunca stop kodonlar ve 3'UTR'lerin etrafında yoğunlaşmışlardır. 6mA, prokaryotlarda metillenmemiş DNA'yı tespit ve degrade ederek savunma görevi sürdüren ve "restriksiyon modifikasyon sistemleri" olarak adlandırılan yaygın bir modifikasyon türüdür. 6mA ayrıca prokaryotlarda DNA onarımını, replikasyonunu ve transkripsiyonu da düzenler. Son zamanlarda ökaryotik hücrelerde de tespitiyle birlikte memelilerde de epigenetik bir rolü olduğu düşünülmektedir (47,48).

GWAS çalışmaları sonucu FTO geni, her tipten obezite çeşitleriyle en güçlü ilişkili gen olarak tespit edilmiştir. FTO geni, hipotalamusta iştah kontrol bölgesinde

eksprese olur. FTO genetik varyantları, diyet faktörleri ve vücut ağırlığı arasındaki ilişkiler hala araştırılmaktayken bazı FTO genetik varyantlarının kilo alım riskini arttırdığı, daha fazla gıda tüketimine neden olduğu ve iştah-kontrol merkezini etkilediği tespit edilmiştir. Özellikle FTO (rs9939609) varyantının 'A' allellinin, artmış BMI, artmış enerji alımı ve azalmış tokluk hissi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (49,50).

Hepatik FTO mRNA ekspresyonundaki değişiklikler, glukoneojenik genler olan PCK1 ve G6PC mRNA'larının ekspresyon seviyesindeki değişikliklerle örtüşmesi, FTO'nun karaciğerdeki glukoneojenik genlerin ekspresyonunu pozitif olarak düzenlediğini düşündürür. FTO eksikliğinin, hiperglisemiye tersine çevirdiği ve normal ve obez / diyabetik farelerde glukoz toleransını iyileştirdiği gösterilmiştir. Aynı şekilde fareler üzerinde yapılan çalışmalarda karaciğere özgü FTO aşırı ekspresyonunun, açlık glukoz ve insülin seviyelerinde artış ve bozulmuş glukoz toleransı ile sonuçlandığı gösterilmiştir. FTO'nun hepatic glukoz ve lipid metabolizmaları üzerine etkisi şekil 4'te özetlenmiştir (51).



Şekil 4:FTO geninin hepatik glukoz ve lipid metabolizmaları üzerine etkisi (51)

2.1.4.3. PPARGC1A geni

PPARGC1A geni, çeşitli dokularda metabolik hücre regülatörü görevini yapan ve tip 2 diyabet etiyojisi çalışmalarında sıklıkla araştırılmakta olan peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama koaktivatör 1-alfa (PGC-1 α) proteini kodlar. PGC-1 α , 91 kd'luk, trikarboksilik asit döngüsünün ve mitokondriyal yağ asidi oksidasyon yolunun çeşitli genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek lipid

metabolizmasını ve uzun zincirli yağ asidi oksidasyonunu düzenleyen bir proteindir (52).

PGC-1 α , mitokondriyal biyogenez, iskelet kasında egzersize adaptasyon ve lif-tipi değişim, kahverengi adipositlerde soğukla indüklenen termojenez, açlığa adaptasyon ve glikoz homeostazının sürdürülmesinde rol oynamaktadır. PPARGC1A geninin, yüksek yağlı aşırı beslenme ya da açlık gibi değişen diyet şartlarına yanıt olarak DNA metilasyonu ile epigenetik olarak düzenlendiği de gösterilmiştir. PGC-1 α , karaciğerde hızlı indüklenen glukoneogenez ve yağ asidi oksidasyonunu desteklemektedir (53).

Özellikle, Tip 2 Diyabetes mellituslu ve prediyabet bireylerin iskelet kaslarında, PGC-1 α -duyarlı genlerinin ekspresyonundaki azalmaya paralel olarak PGC-1 α ekspresyonu ve ona eşlik eden transkripsiyon aktiviteleri de azalmıştır. Benzer şekilde insülin dirençli bireylerin beyaz yağ dokusunda, PGC-1 α mRNA ve protein ekspresyonları azalmış olarak bulunmaktadır. Tip 2 diyabet ve insülin direnci gelişinde rolü olduğu düşünülen PGC-1 α anti-diyabetik ilaç tedavisinde hedef haline gelmiştir (54).

PGC-1 α 'nın en sık mutasyonlarından biri , kalıntı 482'de olan ve Gly482Ser polimorfizmi olarak adlandırılan glisinden serine dönüşümdür. Bu varyant sıklıkla insülin direnci, tip 2 diyabet gelişimi, obezite, değişmiş lipid metabolizması ve hipertansiyon ile ilişkilendirilmektedir. Özellikle Ser 482 alleli hipertansiyon ve Tip 2 diyabet ile daha yakından ilişkilidir (55). Benzer şekilde PGC-1 α 'nın diğer varyantlarının da (rs10212638, rs10517030 ve rs10517032) tip 2 diyabet ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, rs10517030 varyantında oral glukoz tolerans testi

sırasında şeker yüklenmesine karşı insülin sekresyon cevabında azalmayla ilişkili olduğu görülmüştür (56).

PGC-1 α , sinyal yolları (AMPK, mTORC1), transkripsiyon faktörleri (HIF1- α ve protein ekspresyonu (GLUT) yolu üzerinden kanser hücrelerin de enerji dengesi, glikoliz ve oksidatif fosforilasyon basamaklarını etkiler. Bu sebeple de bu genin melanom , meme kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri, kolon, hepatokarsinom ve renal hücreli karsinom gibi bir çok kanser türüyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (57).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Çalışmaya, SBÜ Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran ve Tip 2 diyabet tanısı almış 100 hasta gönüllü birey ve 94 sağlıklı gönüllü birey dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm bireylere çalışma hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü onay formları imzalatılmıştır.

Hasta ve kontrol gruplarına katılan bireylerden kan örnekleri 2ml'lik etilen diamin tetra asetatlı (K_2EDTA) ve jel separatörlü katkısız tüplere toplanmıştır. EDTA'lı tüplerdeki periferik kan lökositlerinden elde edilen DNA örneklerinden GHRL (rs4684677), FTO (rs8044769) ve PGC-1 α (rs8192678) gen polimorfizmlerini saptamak için Real-Time PCR Reaksiyonu (qPCR), Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Tetra-primer Amplifikasyon Refrakter Mutasyon sistem PCR teknikleri kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Materyal

3.2.1. Kullanılan Kimyasallar

“Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorür (Sigma A-5666), Asetik asit (Merck K-04134156), Borik asit (Sigma B-6768), dNTP seti (MBI Fermentas), EDTA (dihidrat) (Merck K-90602121), Etanol (%99), Brom fenol mavisi (Sigma B-6896), Etidyum bromür (Sigma E-8751), Mineral yağ (Sigma M-5904), Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Sodyum dodesil (lauril) sülfat (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C754962), Potasyumdihidrojenfosfat (Merck A-741071), Sodyum klorür (Carlo Erba 368257), Tris baz (Sigma T-1503), Taq DNA polimeraz

(Invitrogen), DNA marker (50-100 bp DNA size marker; MBI Fermentas), Proteinaz K (Sigma), Potasyum hidroksit (Sigma P 1767), restriksiyon enzimleri (MspI, BpiI, BstUI), primer dizileri (MBI Fermentas).”

3.2.1.1. Kullanılan Primerler

GHRL (rs4684677), “polimorfizminin gözleendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir.”

GHRELİN (rs4684677), F1	5’-TGGCTGTGCTGCTGGTACT-3’
GHRELİN (rs4684677), F2	5’-TGGCTGTGCTGCTGGTACC-3’
GHRELİN (rs4684677), R	5’-AGATGGTGAGTGGGAAGGTG-3’

FTO (rs8044769) “polimorfizminin gözleendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir”

FTO (rs8044769) F1	5’-AGTGTCATTAGCAGCATAATCTTG-3’
FTO (rs8044769) F2	5’-AGTGTCATTAGCAGCATAATCTTC-3’
FTO (rs8044769) R	5’-CAGAAACTACACCAGCCCTA -3’

PGC-1 α (rs8192678) “polimorfizminin gözleendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir”

PGC α (rs8192678) F	5’-TGTCATCAAACCTGGCCATACA-3’
PGC α (rs8192678) R1	5’-CGACGAAGCAGTCAAGAACG-3’
PGC α (rs8192678) R2	5’-CGACGAAGCAGTCAAGAACA-3’

3.2.2. Kullanılan Aletler

“Roche LightCycler 96, Biorad CFX 96 Touch, Thermal Cycler cihazı (Gold Plate), Otoklav, Etüv, Hot plate, Dijital Görüntüleme sistemi, Hassas terazi (Mettler), Isıticılı manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj, pH metre (Hanna), Pipet takımı (Eppendorf), Falkon santrifüj (Hettich), Spektrofotometre Biochrom-S2100 diode array spectrophotometer), Su banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), CFX Maestro 1.1”.

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. DNA izolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.3.1.1. “Eritrosit Parçalama Tamponu”

“8,74 gram amonyum klorür, 1 gram potasyum bikarbonat, 200µl 0,5 molarlık EDTA’nın tartımları yapılarak erlen içine alınır. 900ml ddH₂O eklenir ve çözeltinin pH’sı bir normal sodyum hidroksit çözeltisi ile 7.4’e ayarlanır. Daha sonra balon joje içine alınarak bir litreye tamamlanır. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişeye alınarak 120°C’ye alınarak 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra +4°C’de saklanır”.

3.3.1.2. “0,5 M Disodyum Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) pH:8.0”

“186,1 gram etilen diamin tetra asetat tartılarak beher içine alınır ve 800ml ddH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürülür ve pH’sı sodyum hidroksit çözeltisi ile 8.0’e ayarlanarak ddH₂O ile 1lt’ye tamamlanır. Çözelti 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir”.

3.3.1.3. “4 M Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi”

“233,6 gram sodyum klorür tartılarak erlene alınır. Üzerine 800ml ddH₂O ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürülür. Balon jojeye aktarılarak 1lt’ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir”.

3.3.1.4. “Lökositleri Parçalama Tamponu”

“25ml 4M sodyum klorür ve 50ml 0.5M EDTA direkt balon jojeye aktarılarak 1lt’ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra oda ısısında saklanır”.

3.3.1.5. “ Molar Tris Tamponu (Stok)”

“121,1gram Tris baz tartılarak bir behere alınır. Üzerine 42µl hidroklorik asit ile yaklaşık 800ml ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürülür. Daha sonra balon jojeye aktarılır ve 1lt’ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir”.

3.3.1.6. “9,5 Molar Amonyum Asetat Çözeltisi”

“73,22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alınır. Üzerine 80ml ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürülür. Balon jojeye aktarılır ve ddH₂O ile 100ml’ye tamamlanır. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilir ve +4°C’de saklanır”.

3.3.1.7. “%10’luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi”

“10 gr sodyum dodesil sülfat tartılır. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek beher içine alınır. Üzerine 80ml ddH₂O eklenir. Manyetik karıştırıcı yardımı ile

çözündürülür. pH'sı 7,2'ye ayarlanır. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilir ve oda ısısında saklanır.”

3.3.1.8. “Proteinaz K (20 mg/ml)”

“20 mg proteinaz K tartılarak steril bir gode içinde steril ddH₂O ile 1ml’ye tamamlanır ve -20°C’de saklanır”.

3.4. Kullanılan yöntemler

3.4.1. “Periferik Kandan DNA İzolasyonu”

“EDTA’lı tüplerle alınan 2ml.lik kan örnekleri çalışma için falkon tüplerine aktarılır. Üzerlerine 1:3 oranında lysis eklenerek +4°C’de 15dk. bekletilir. Daha sonra 1500rpm’de 10dk. santrifüj edilir ve süpernatant kısımları atılarak pelletler tamamen süspansiyon durumuna getirilir ve üzerlerine tekrar 15-20ml. lysis eklenir. Örnekler +4°C’de 15dk. bekletildikten sonra 10dk.1500rpm’de santrifüj edilir. Süpernatant kısımları atılır ve süspansiyon olan pellet üzerine 500 µl %10’luk SDS, 75 µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9,4 ml lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56°C’de su banyosunda bir gece inkübe edilir. İnkübasyondan sonra her 1ml örnek başına 0,37 ml olacak şekilde 9,5M’lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra karıştırılır ve 3000 rpm’de 25dk santrifüj edilerek proteinler çöktürülür. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir falkona aktarılır ve üzerine 1:2 oranında %99’luk mutlak alkol eklenir ve DNA’nın presipitasyonu sağlanır. Yoğunlaşan DNA’nın alkol yüzeyine çıkması beklenir ve DNA mikropipet ucuyla alınır. DNA %70’lik alkolde yıkanır ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisinde çözündürülerek +4°C’de saklanır”.

3.4.1.1. “Elde Edilen DNA’nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini”

“Elde edilen DNA örneklerinde konsantrasyon ve miktar tayini yapmadan önce her örnekten 20µl alınarak üzeri 380µl 0,5XTE tamponu ile tamamlandı ve bu şekilde 1/20 dilüsyonu sağlandı. Bu dilüsyon örneklerinin daha sonra spektrofotometrede 260nm ve 280 nm dalga boylarında optik dansite (OD) ölçümleri yapıldı”.

“Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA’nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. OD_{260} / OD_{280} oranı 1,7-1,8 olan DNA’lar temiz olarak kabul edildi. DNA’nın 50µg/ml çift iplikçikli içeriğinin 260 nm dalga boyunda bir OD verdiği kabul edilmektedir. 260 nm’deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı”.

“*DNA Konsantrasyonu (ng/µl): Sulandırma katsayısı (100) x A_{260} x 50”

“DNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA’nın OD_{260}/ OD_{280} değeri yaklaşık 1,8’dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,8’den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2’den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir”.

3.4.2. “PCR Yöntemiyle GHRL (rs4684677), FTO (rs8044769) ve PGC-1α (rs8192678) Gen Bölgelerinin Çoğaltılması, RFLP ve Tetra-Arm Yöntemiyle Polimorfizm Analizi”

Genomik DNA örneklerinde GHRL, FTO ve PGC-1α gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldı. DNA örneklerinin her birinin amplifikasyonu için 2xqPCR tamponu mix tamponu ile (10mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,75 mM MgCl₂), 2,5mM dNTP, 0,1 ünite Taq DNA polimeraz ve FTO, FABP2, TCF7L2 gen bölgelerine özgü her bir primer setinden 100pmol/µl ve 500ng DNA içeren toplam 10µl’lik PZR karışımı hazırlandı

3.4.3. GHRL, FTO ve PGC-1 α gen bölgelerinin PCR Yöntemi İle Çoğaltılması

“GHRL (rs4684677), FTO (rs8044769) ve PGC-1 α (rs8192678) optimize edilmiş PCR protokolü Tablo 3’de verilirken, üç gen için PCR şartları da Tablo 4’de özetlenmiştir”.

Tablo 5: GHRL, FTO ve PGC-1 α genleri için PCR protokolü

Kimyasallar	Miktarlar
2xqPCR Mix	5 μ L
Forward Primer	0,025 μ L
Reverse Primer	0,025 μ L
Sybr Green	0,06 μ L
Moleküler Ölçekli Su	2,84 μ L
Template-DNA	2,0 μ L

Tablo 6: PCR şartları

1	95°C	5dk
2	95°C	10sn
3	65°C	30sn
	Plate okuma	
4	2’ye git (39 döngü)	
5	Melting Curve (65°C’den 95°C’e çık)	Artış 0.5°C
	5sn	Plak okuma
	son	

3.4.4. PCR Ürünlerinin Kontrolü

“GHRL (rs4684677), FTO (rs8044769) ve PGC-1 α (rs8192678) genlerine ait istenilen bölgelerinin PCR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacı ile melting pikleri değerlendirildi. Buna göre yapılan bütün çalışmalarda istenilen PCR ürünlerinin oluştuğu tespit edilmiştir”.

3.4.5. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Çalışmamızdaki gruplara ait demografik bilgiler ile gen ve allellerin istatistiksel kıyaslamalarında SPSS 21.0 programı kullanılmıştır.

Tanımlayıcı istatistik çalışması ve normal dağılıma uygunluluk testi çalışıldı. Sonrasında One Way ANOVA testi ve Post-Hoc testi ile parametrelerin gruplardaki anlamlılık değerlendirilmesi yapıldı. Kruskal-Wallis testi kullanılarak parametrelerin gruplar arasındaki anlamlılıkları hesaplandı. Gruplardaki genlerin ve allellerin farklılık ve anlamlılıklarının saptanması için Ki Kare ve Fisher Exact testleri kullanıldı.

BULGULAR

Çalışma gruplarına ait biyokimyasal ve demografik veriler tablo 7’de özetlenmiştir. Buna göre hasta grubunda açlık kan şekeri ($p<0,001$, %95 Güven aralığı=78,33-102,66), üre ($p<0,001$, %95 Güven aralığı=4,51-10,82), kreatinin ($p<0,001$, %95 Güven aralığı=0,08-0,23), Vücut Kitle İndeksi ($p<0,001$, %95 Güven aralığı=1,71-5,38), trigliserid ($p=0,001$, %95 Güven aralığı=24,78-89,69) ve Total Kolesterol/HDL ($p=0,013$, %95 Güven aralığı=0,086-0,73) düzeyleri sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır. Kontrol grubunda ise hasta grubuna göre HDL düzeyleri istatistiksel olarak artmıştır ($p=0,002$, %95 Güven aralığı=1,91-8,79).

Tablo 7: Çalışma gruplarına ait biyokimyasal ve demografik parametreler

GRUP	HASTA (n= 100)	KONTROL (n= 94)
Cinsiyet (Kadın/erkek)	57/43	59/35
Yaş (yıl)	56,58±10,23	50,49±12,62
Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²)	31,04±5,89	27,49±6,92
Açlık Kan şekeri (mg/dl)	181,92±58,95*	91,42±8,16
Trigliserid (mg/dl)	175,33±120,71*	118,09±105,36
Total kolesterol (mg/dl)	207,55±43,74	206,82±47,49
HDL-kolesterol (mg/dl)	48,84±10,47	54,19±13,20***
LDL-kolesterol (mg/dl)	126,35±36,42	129,93±39,34
HbA1c (%)	8,34±1,66	5,35±0,31
Total kolesterol / HDL- kolesterol	4,39±1,10**	3,98±1,13
AST (U/L)	20,34±8,34	20,16±9,85
ALT (U/L)	22,04±11,05	22,63±18,28
Üre (mg/dl)	34,06±13,62*	26,39±7,92
Kreatinin (mg/dl)	0,81±0,30*	0,65±0,16

*p<0,001, **p=0,013, *** p=0,002

Tablo 8’de FTO (rs8044769) genotip ve allel dağılımları gösterilmiştir. Hasta grubunda kontrol grubuna göre TT genotipi taşıma sıklığı istatistiksel olarak artmıştır (p=0,021, $\chi^2= 5,30$ OR= 1,98, %95 Güven aralığı= 1,10-3,57). Kontrol grubunda ise C

alleli taşıma sıklığı hastalara göre istatistiksel olarak yükselmiştir ($p=0,021$, $\chi^2= 5,30$ OR= 1,30, %95 Güven aralığı= 1,03-1,64).

Tablo 8: Çalışma gruplarında FTO (rs8044769) genotip ve allel dağılımları

FTO (rs8044769)	HASTA (n= 100)	KONTROL (n= 94)
GENOTİP		
CC	18(%18)	21(%22,3)
TT	47(%47)*	29(%30,9)
CT	35(%35)	44(%46,8)
ALLEL		
C	71(%35,5)	86(%45,7)**
T	129(%64,5)	102(%54,3)

* $p=0,021$, $\chi^2= 5,30$ OR= 1,98, %95 Güven aralığı= 1,10-3,57

** $p=0,021$, $\chi^2= 5,30$ OR= 1,30, %95 Güven aralığı= 1,03-1,64

Tablo 9’da GHRL (rs4684677) genotip ve allel dağılımları gösterilmiş olup gruplararası dağılımlarda bir farklılık saptanmamıştır.

Tablo 9:Çalışma gruplarında GHRL (rs4684677) genotip ve allel dağılımları

GHRL (rs4684677)	HASTA (n= 100)	KONTROL (n= 94)
GENOTİP		
AA	95(%95)	86(%91,5)
TT	-	-
AT	5(%5)	8(%8,5)
ALLEL		
A	195(%97,5)	180(%95,7)
T	5(%2,5)	8(%4,3)

Tablo 10’da PGC-1 α (rs8192678) genotip ve allel dağılımları gösterilmiştir. Hasta grubunda GG taşıma sıklığı sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak artmıştır ($p<0,001$, %95 Güven aralığı=1,19-1,49). Sağlıklı kontrollerde ise GA genotipi ($p=0,003$, $\chi^2= 8,85$, OR= 1,24, %95 Güven aralığı= 1,07-1,43) ve A alleli ($p<0,001$, %95 Güven aralığı= 1,19-1,49) taşıma sıklığı hasta grubuna göre istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır.

Tablo 10: Çalışma gruplarında PGC-1 α (rs8192678) genotip ve allel dağılımları

PGC-1 α (rs8192678)	HASTA (n= 100)	KONTROL (n= 94)
GENOTİP		
GG	25(%25)*	-
AA	4(%4)	11(%11,7)
GA	71 (%71)	83(%88,3)**
ALLEL		
G	121(%60,5)	83(%44,1)
A	79(%39,5)	105(%55,9)***

* p<0,001, %95 Güven aralığı=1,19-1,49

** p=0,003, $\chi^2= 8,85$, OR= 1,24, %95 Güven aralığı= 1,07-1,43

***p<0,001, %95 Güven aralığı= 1,19-1,49

Tablo 11’de çalışma gruplarında FTO (rs8044769) genotipinin biyokimyasal profillere göre dağılımı verilmiştir. Buna göre hasta grubun için TT genotipi taşıyanlarda CT genotipi taşıyanlara göre LDL düzeyleri (p=0,048, %95 Güven aralığı= 1,17-32,54) ve Total kolesterol/HDL oranı (p=0,035, %95 Güven aralığı= 0,03-1,01) istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Kontrol grubunda ise CC genotipi taşıyanlarda hem TT (p=0,012, %95 Güven aralığı=16,99-134,27) hem de CT genotipi (p=0,002, %95 Güven aralığı= 31,17-139,58) taşıyanlara göre trigliserid düzeyleri anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 11: Çalışma gruplarında FTO (rs8044769) genotipinin biyokimyasal profillere göre dağılımı

GRUP	HASTA (n= 100)			KONTROL (n= 94)		
	CC (n= 18)	TT (n= 47)	CT (n= 35)	CC (n= 21)	TT (n= 29)	CT (n= 44)
FTO (rs8044769)						
Trigliserid (mg/dl)	150,50± 87,50	197,80± 153,25	158,06± 74,25	181,70± 193,55** *	106,07± 49,44	96,33± 52,56
Total kolesterol (mg/dl)	208,78± 45,19	214,24± 47,34**	197,85± 36,80	216,45± 57,32	210,89± 52,63	199,70± 38,18
HDL-kolesterol (mg/dl)	51,67± 11,17	47,26± 10,40	49,47± 10,13	50,65± 12,62	58,18± 15,09	53,23± 11,73
LDL-kolesterol (mg/dl)	127,00± 29,83	133,15± 38,10*	116,79± 36,07	134,40± 46,38	131,46± 45,61	126,86± 31,38
Total Kolesterol/HDL- Kolesterol	4,13± 0,89	4,67± 1,16	4,14± 1,05	4,40± 1,19	3,79± 1,15	3,90± 1,06
Vücut Kitle İndeksi (kg/m²)	30,33± 5,88	31,84± 5,91	30,29± 5,88	27,5751± 3,50	28,0654± 8,45	27,0640± 7,14
Açlık Kan Şekeri (mg/dl)	174,56± 43,19	184,96± 59,58	181,62± 66,10	91,29± 9,84	89,96± 9,47	92,41± 6,21
HbA1c (%)	8,30± 1,79	8,37± 1,65	8,33± 1,66	5,3± 0,32	5,39± 0,31	5,33± 0,31

* p=0,048, **p=0,035, *** p=0,012 ve p=0,002

Tablo 12’de çalışma gruplarında GHRL (rs4684677) genotipinin biyokimyasal profillere göre dağılımı verilmiş olup istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır.

Tablo 12:Çalışma gruplarında GHRL (rs4684677) genotipinin biyokimyasal profillere göre dağılımı

GRUP	HASTA (n= 100)			KONTROL (n= 94)		
GHRL (rs4684677)	AA (n= 95)	TT (n= 0)	AT (n= 5)	AA (n= 86)	TT (n= 0)	AT (n= 8)
Trigliserid (mg/dl)	174,43± 122,55	-	192,00± 86,94	119,80± 108,93	-	100,38± 57,79
Total kolesterol (mg/dl)	206,40± 44,49	-	229,00± 16,27	205,12± 44,40	-	224,50± 74,18
HDL-kolesterol (mg/dl)	48,81± 10,59	-	49,40± 8,98	53,77± 13,13	-	58,50± 14,12
LDL-kolesterol (mg/dl)	125,55± 37,02	-	141,20± 18,68	128,41± 37,39	-	145,75± 56,59
Total Kolesterol/HDL- Kolesterol	4,37± 1,12	-	4,74± 0,65	3,99± 1,16	-	3,79± 0,72
Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²)	30,97± 5,94	-	32,24± 5,04	27,43± 6,93	-	28,07± 7,28
Açlık Kan Şekeri (mg/dl)	184,31± 59,43	-	137,00± 19,31	91,58± 7,93	-	89,75± 10,79
HbA1c (%)	8,42± 1,67	-	6,92± 0,31	5,36± 0,31	-	5,20± 0,28

Tablo13’de PGC-1 α (rs8192678) genotipinin biyokimyasal profillere göre dağılımı gösterilmiştir. Hasta grubunda, AKŞ ve BMI düzeyleri GA genotipi taşıyanlarda GG taşıyanlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,029, %95 Güven aralığı= 3,08-56,83; p=0,019, %95 Güven aralığı= 0,53-5,88). Kontrol grubunda ise anlamlı bir fark görülmemiştir.

Tablo 13:Çalışma gruplarında PGC-1 α (rs8192678) genotipinin biyokimyasal profillere göre dağılımı

GRUP	HASTA (n= 100)			KONTROL (n= 94)		
PGC-1 α (rs8192678)	GG (n= 25)	AA (n= 4)	GA (n= 71)	GG (n= 0)	AA (n= 11)	GA (n= 83)
Trigliserid (mg/dl)	165,00 $\pm$ 142,23	178,75 $\pm$ 132,75	178,87 $\pm$ 113,21	-	91,30 $\pm$ 49,00	121,40 $\pm$ 110,08
Total kolesterol (mg/dl)	204,16 $\pm$ 36,06	241,00 $\pm$ 53,69	206,84 $\pm$ 45,52	-	210,80 $\pm$ 58,24	206,33 $\pm$ 46,40
HDL-kolesterol (mg/dl)	49,68 $\pm$ 10,69	56,75 $\pm$ 8,18	48,07 $\pm$ 10,42	-	61,60 $\pm$ 7,86	53,27 $\pm$ 13,47
LDL-kolesterol (mg/dl)	124,80 $\pm$ 30,17	148,50 $\pm$ 24,42	125,62 $\pm$ 38,91	-	130,40 $\pm$ 52,01	129,88 $\pm$ 37,90
TK/HDL	4,29 $\pm$ 1,20	4,23 $\pm$ 0,56	4,43 $\pm$ 1,09	-	3,44 $\pm$ 0,89	4,04 $\pm$ 1,14
Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²)	28,66 $\pm$ 3,95	31,26 $\pm$ 2,89	31,87 $\pm$ 6,38**	-	28,52 $\pm$ 13,47	27,36 $\pm$ 5,80
Açlık Kan Şekeri (mg/dl)	159,80 $\pm$ 54,70	183,00 $\pm$ 73,51	189,76 $\pm$ 58,49*	-	90,00 $\pm$ 8,77	91,61 $\pm$ 8,11
HbA1c (%)	7,97 $\pm$ 1,08	7,67 $\pm$ 0,51	8,52 $\pm$ 1,84	-	5,27 $\pm$ 0,43	5,36 $\pm$ 0,29

* p =0,029, ** p =0,019

TARTIŞMA

Çalışmamızda, Tip 2 DM'lu hastalar ve kontrol gruplarını özellikle metabolik sendrom, obezite ve Tip 2 DM ile ilişkilendirilen GHRL, FTO ve PGC-1 α genlerinde görülebilen belirli polimorfizmler açısından birbirleriyle kıyaslamak ve bu polimorfizmlerin biyokimyasal parametrelerle olan ilişkilerini göstermeyi amaçladık.

Ghrelin yolağı son yıllarda, leptin ve adinopektin yolaklarıyla ilişkisi ,enerji metabolizmasının kontrolü ve beslenme alışkanlıklarını düzenlemesi açısından araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Ayrıca Ghrelin ve Ghrelin geni, glukoz homeostazına etkilerinden dolayı Tip 2 DM gelişimi açısından aday olarak gösterilmektedir ve Tip 2 DM ile ilişkilerini araştıran bir takım çalışmalar da yapılmıştır. Benzer şekilde 610 Tip 2 DM'li birey ve 820 sağlıklı kontrol bireyi içeren Fransız popülasyonunda yapılan bir çalışmada Ghrelin ve Ghrelin geninin Tip 2 DM ile ilişkisinin olmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada Ghrelinin her ne kadar Tip 2 DM ile ilişkili olmadığı bildirilse de bu genin over kanseri, obez ve hipertansiyon ile ilişkilendirilebileceği vurgulanmıştır (58).

Faris ve arkadaşlarının Suudi toplumunda yürüttükleri ve bizim de araştırdığımız Ghrelin'in rs4684677 polimorfizmini içeren çalışmalarında, Ghrelin genindeki polimorfizmlerin Tip 2 DM ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir (59). Bunların yanında Li ve arkadaşlarının yürüttüğü 11 merkez ve 8,194 katılımcı içeren Tip 2 DM ve GHRL geni Leu72Met Polimorfizm ilişkisini araştıran bir meta-analiz çalışması da mevcuttur. Katılımcılar arasında Çin, Danimarka,Finlandiya, Fransa ,Almanya ve Kore'yi de içeren 6 ülke bulunmaktaydı. Bu çalışmanın sonuçlarına göre Çin'li bireylerde Leu72Met Polimorfizmi ve Tip 2 DM arasında ilişki saptanırken diğer ülke vatandaşlarında böyle

bir ilişki saptanamamıştır (60). Bu çalışmaların tam tersi olacak şekilde Meksika popülasyonunda yapılan bir çalışmada ise Leu72Met Polimorfizminin Tip2DM gelişimini engellediği bildirilmiştir (61). Bizim kendi popülasyonumuzda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda ise GHRL (rs4684677) genotip ve allel dağılımları açısından Tip 2DM ve kontrol grubu arasında bir fark saptanamamıştır. Aynı şekilde iki grup arasında GHRL (rs4684677) genotiplerinin biyokimyasal profillere göre dağılımları açısından istatistiksel bir anlamlılık saptanamamıştır. Diyabet gelişim riski etnik kökenlerden ve çevresel faktörlerden etkilendiği için farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar bulunmuştur.

FTO geni ise yapılan bir çok çalışma sonrasında özellikle gıda alımını arttırması, obezite ve ona bağlı metabolik sonuçlar ile ilişkilendirilmiştir. FTO (rs8044769) varyantının incelendiği bir çalışmada, heterozigot olarak CT taşıyan bireylerin yüksek kiloya, yüksek BMI değerlerine ve yüksek oranda yağ dokusuna sahip oldukları gözlemlenmiştir. Ayrıca homozigot olarak CC ve TT taşıyan bireylerde ise oral glukoz tolerans testi için glukoz yüklenmesinin ikinci saatinde yüksek insülin seviyeleri tespit edilmiştir. Aynı şekilde homozigot gruplarda yüksek HOMA-IR değerleri elde etmişlerdir (62). Bizim çalışmamızda ise hasta grubumuzda TT genotipi taşıma sıklığı kontrol grubuna göre istatistiki şekilde anlamlıydı. Biz de bu çalışmaya benzer şekilde TT genotipi taşıyan bireylerde LDL ve Total Kolesterol/HDL oranını diğer genotiplere sahip bireylere göre daha yüksek bulduk.

İran'da obez hastalar üzerinde yapılan bir çalışmaya göre ise FTO gen polimorfizmlerinin (rs9939609 ve rs17817449) diyabet gelişimi ile ilişkili oldukları tespit edilmiştir. Bu çalışmaya göre minör T allellinin (rs9939609) homozigot olduğu durumlarda obez bireylerde Tip 2DM gelişme riskini 3 kat arttırdığı tespit edilmiştir.

FTO rs17817449 varyantının ise kilo alımını direkt, Tip2 DM gelişme riskini ise dolaylı yoldan arttırdığı vurgulanmıştır. Ayrıca bu çalışılan SNP'leri içeren bireylerin metabolik sendrom, dislipidemi ve insülin direncine daha yatkın olduklarını bildirmişlerdir (63). Biz de çalışmamızı her ne kadar aynı gen ve aynı hasta grupları üzerinden yapmış olsak da çalıştığımız varyant bu çalışmadan farklıydı. Fakat FTO geninin başka bir varyantının da Tip 2DM ile ilişkilendirilebileceğini göstermiş olduk.

FTO rs8044769 varyantı ve diyabet ilişkisini araştıran fazla çalışma olmamasına rağmen genel olarak BMI ve osteoartrit ilişkisini araştıran çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda ise bu varyantın BMI artışı ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir (64,65). Bu çalışmalarda da farklı sonuçlar elde edilmesi çalışmanın yapıldığı coğrafya, beslenme stillerindeki farklılıklar ve etnik köken farklılıkları gibi sebeplere dayanıyor olabilir.

FTO rs8044769 varyantını da içeren ve farklı genlerin 14 adet SNP'lerini inceleyen bir çalışma aynı bölgede yaşayan 238 sağlıklı bireyin katılımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada gönüllülere 30 dakikalık submaksimal aerobik egzersiz yaptırılmış ve sonrasında VO₂Max, kalp atım hızı, tansiyon, sıcaklık, laktat ve norepinefrin ölçümü gibi bir takım fizyolojik testler üzerinden gönüllülerin egzersize verdikleri metabolik cevap araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre egzersize en olumlu cevabı homozigot olarak TT alleli taşıyan bireylerin verdiği gözlemlenmiştir. Obezite ve yüksek BMI ile ilişkilendirilmiş bu genin en olumlu cevabı veriyor olması çalışmanın obez bireylerle de yapılması gerektiğini göstermiştir (66).

PGC-1 α geni ise hücrel enerji metabolizması kontrolü sebebiyle insülin direnci, diyabet ve metabolik sendrom çalışmalarında sıklıkla araştırılmaktadır. Xia ve arkadaşları da PGC-1 α rs8192678 polimorfizmi ve Tip 2DM ilişkisini araştıran bir

meta-analiz gerçekleştirmişlerdir. Bu meta-analiz 20 farklı çalışma ve 16,000 katılımcı içeriyordu. Çalışmaları Doğu Asya, beyaz ırk, kıızılderili ve Afrikalı alt grupları içermektedir. Beyaz ırk ve kıızılderili'li gruplarda A alelli taşıyan bireylerde Tip 2DM gelişme riskini yüksek bulmuşlardır. Ayrıca bunların arasında AA genotipine sahip bireylerin Tip 2DM gelişimi için daha fazla riskli grupta olduğunu bildirmişlerdir. Fakat Afrikalı grupta AA genotipine sahip bireyler olmaması sebebiyle AA genotipi ile Tip 2DM arasında ilişki tespit edememişlerdir (67).

Tunus'da aynı coğrafik bölgede yaşayan ve aynı etnik gruba sahip 889 Tunuslu üzerinde yapılan çalışma sonucunda PGC-1 α rs8192678 polimorfizmi ve Tip 2DM arasında ilişki tespit edilmiştir. Aynı çalışma kendilerinin ilişki bulabilmesine rağmen Japon, Çin, Fransız ve Pima yerlileri üzerinde yapılan çalışmalarda PGC-1 α rs8192678 polimorfizmi ve Tip 2DM arasında ilişki bulmadıklarından bahsedilmiştir. Bu durumu farklı etnik gruplarda farklı allel dağılım sıklığı olabileceğinden bahsederek aydınlatmaya çalışmışlardır (68).

İtalya'da 223 normal glukoz tolerans değerlerine sahip obez ve 125 bozulmuş glukoz tolerans değerlerine sahip obez bireyler üzerinde insülin direnci ve PGC-1 α rs8192678 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma gerçekleştirilmiş. Heterozigot ve homozigot allel taşıyan bireylerde ,taşınmayanlara göre daha yüksek HOMA-IR ve insülin değerleri tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda obez bireylerde bu varyantın yüksek insülin direnciyle beraber gittiği sonucuna varmışlardır (69). Bizim çalışmamızda ise her ne kadar insülin ölçümü yapmamış da olsak, GG allelini taşıyan bireylerde yüksek açlık kan şekeri ve vücut kitle indeksi değerleri olduğunu tespit ettik.

Sonuç olarak, GHRL (rs4684677) için diyabet ve kontrol grupları arasında fark bulamazken, FTO (rs8044769) varyantı için TT genotipini ve PGC-1 α (rs8192678)

varyantı için GG genotipini taşıyanlara, hasta grubunda daha sık olarak rastlanıldığını tespit etmiş olduk. Daha önce de belirttiğimiz gibi bulgularımızı destekleyen çalışmalar olduğu kadar ters düşen çalışmalar da mevcuttur. Birbiriyle uyumsuz sonuçların örnek büyüklüğü, etnik farklılıklar, çalışma dizaynı ve dahil etme/dışlama kriterleri gibi bir çok nedeni olabilir. Bunların dışında çalışmalarda kullanılan hasta ve kontrol grubu farklılıkları, yaş ve çevresel faktörler de sonuçların uyumsuzluğunu açıklayan diğer nedenler arasında sayılabilir. Farklı ya da belirli etnik gruplar arasında çalışmanın tekrarlanmasına ve daha büyük hasta ve kontrol grupları içeren ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Ulusal Diyabet Konsensus Grubu TURKDIAB, Diyabette Tanı ve Tedavi Rehberi. İstanbul: Armoni Nüans Baskı Sanatları A.Ş, 2019; 9, S16
2. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association Diabetes Care, 2019;42, S13–S28Jan
3. Wu TH, Chiu CC, Goh KK, Chen PY, Huang MC, Chen CH ve ark. Relationship between metabolic syndrome and acylated/desacylated ghrelin ratio in patients with schizophrenia under olanzapine medication. J Psychopharmacol. 2020 Jan;34(1):86-92
4. Llamas-Covarrubias IM, Llamas-Covarrubias MA, Martinez-López E, Zepeda-Carrillo EA, Rivera-León EA, Palmeros-Sánchez B ve ark. Association of A-604G ghrelin gene polymorphism and serum ghrelin levels with the risk of obesity in a mexican population. Mol Biol Rep. 2017 Jul;44(3):289-293
5. Hess ME, Brüning JC. The fat mass and obesity-associated (FTO) gene: Obesity and beyond? Biochim Biophys Acta. 2014 Oct;1842(10):2039-47.
6. Li L, Zang L, Zhang F, Chen J, Shen H, Shu L ve ark. Fat mass and obesity-associated (FTO) protein regulates adult neurogenesis. Hum. Mol. Genet. 2017; 31:591–606.
7. Machiela MJ, Lindstrom S, Allen NE, Haiman CA, Albanes D, Barricarte A, Berndt SI ve ark..Association of type 2 diabetes susceptibility variants with advanced prostate cancer risk in the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. Am J Epidemiol. 2012 Dec 15;176(12):1121-9

8. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ.* 2006 Dec;30(4):145-51
9. LeBleu VS, O'Connell JT, Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC ve ark. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol.* 2014 Oct;16(10):992-1003, 1-15
10. Punthakee Z, Goldenberg R, Katz P. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Can J Diabetes.* 2018 Apr;42 Suppl 1:S10-S15
11. von Eckardstein A, Sibling RA. Possible contributions of lipoproteins and cholesterol to the pathogenesis of diabetes mellitus type 2. *Curr Opin Lipidol.* 2011 Feb;22(1):26-32
12. Cade TW. Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting. *Phys Ther.* 2008 Nov; 88(11): 1322–1335
13. Negera ZG, Weldegebriel B, Fekadu G. Acute Complications of Diabetes and its Predictors among Adult Diabetic Patients at Jimma Medical Center, Southwest Ethiopia. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020; 13: 1237–1242.
14. Papatheodorou K, Banach M, Bekiari E, Rizzo M, Edmonds M. Complications of Diabetes 2017. *J Diabetes Res.* 2018; 11: 1-4.
15. American Diabetes Association Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *American Diabetes Association Diabetes Care.* 2014;37, Supplement 1, January 2014
16. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet* 2018; 391:2449–2462.

17. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ ve ark. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17016
18. Kaul, K, Apostolopoulou, Roden M. Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2015: 64, 1629–1639
19. Moini, J. *Epidemiology of Diabetes*, 1st ed.; Elsevier: Cambridge, MA, USA, 2019.
20. Kahaly GJ, Hansen, MP. Type 1 diabetes associated autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* . 2016: 15(7), 644–648
21. Regnell SE, Lernmark Å. Early prediction of autoimmune (type 1) diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(8):1370-1381
22. Kahanovitz L, Sluss PM, Russell SJ. Type 1 diabetes:a clinical perspective. *Point Care*. 2017;16:37–40
23. van Megen KM, Spindler MP, Keij FM, Bosch I, Sprangers F, van Royen-Kerkhof ve ark. Relapsing/remitting type 1 diabetes. *Diabetologia* (2017) 60(11):2252–5
24. Jaacks LM, Siegel KR, Gujral UP, Narayan KMV. Type 2 diabetes: A 21st century epidemic. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016;30: 331–343
25. Ndisang JF, Vannacci A, Rastogi S. Insulin resistance, type 1 and type 2 diabetes, and related complications. *J Diabetes Res*. 2017;3(9):23–45
26. Czech MP. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat. Med*. 23, 804–814 (2017)
27. Weisman A, Fazli GS, Johns A, Booth GL. Evolving trends in the epidemiology, risk factors, and prevention of type 2 diabetes: a review. *Can J Cardiol*. 2018;34(5):552–64.

28. Yanling W, Yanping D, Yoshimasa T, Wen Z. Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. *International Journal of Medical Sciences* 2014; 11(11): 1185-1200.
29. McMacken M, Shah S. A plant-based diet for the prevention and treatment of type 2 diabetes. *J Geriatr Cardiol*. 2017;14(5):342-354
30. Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J*. 2016;92:63-9.
31. Bansal N. Prediabetes diagnosis and treatment: A review. *World J Diabetes*. 6, 296–303
32. Bonnefond A, Froguel P. Rare and common genetic events in type 2 diabetes: what should biologists know? *Cell Metab*. 2015;21:357–368
33. Ali O. Genetics of type 2 diabetes. *World J Diabetes*. 2013 Aug 15; 4(4): 114-123.
34. Brown AE, Walker M. Genetics of insulin resistance and the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep*. 2016; 18:75
35. Mohlke KL, Boehnke M. Recent advances in understanding the genetic architecture of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet*. 2015;24(R1):R85–92
36. Nasykhova YA, Barbitoff YA, Serebryakova EA, Katserov DS, Glotov AS. Recent advances and perspectives in next generation sequencing application to the genetic research of type 2 diabetes. *World J Diabetes*. 2019;10(7):376-395
37. Stumvoll M, Goldstein BJ, Haeften TW. Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. *The Lancet*. 2008; (371): 2153-2155
38. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: From Gene to Physiological Function. *Results Probl Cell Differentiation* 2010;50:185-205.

39. Seim I, Amorim L, Walpole C, Carter S, Chopin LK, Herington AC. Ghrelin gene-related peptides: Multifunctional endocrine/autocrine modulators in health and disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2010) 37, 125–131.
40. Yanagi S, Sato T, Kangawa K, Nakazato M. The Homeostatic Force of Ghrelin. *Cell Metab.* 2018 Apr 3;27(4):786-804
41. Abdalla MM. Ghrelin – Physiological Functions and Regulation. *Eur Endocrinol.* 2015 Aug; 11(2): 90–95
42. Pereira FC, Moraes PM. The Impact of Ghrelin in Metabolic Diseases: An Immune Perspective. *J. Diabetes Res.* 2017, 4527980
43. Mani BK, Shankar K, Zigman JM. Ghrelin's Relationship to Blood Glucose. *Endocrinology.* 2019 May 1;160(5):1247-1261
44. Huang R, Tian S, Cai R, Sun J, Shen Y, Wang S. Ethnicity-Specific Association Between Ghrelin Leu72Met Polymorphism and Type 2 Diabetes Mellitus Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. *Front Genet.* 2018;9 [citado 23 de octubre de 2019].
45. Huang R, Han J, Tian S, Cai R, Sun J, Shen Y ve ark. Association of plasma ghrelin levels and ghrelin rs4684677 polymorphism with mild cognitive impairment in type 2 diabetic patients. *Oncotarget*, 2017; 8(9):15126-15135
46. Lan N, Lu Y, Zhang Y, Pu S, Xi H, Nie X ve ark. FTO – A Common Genetic Basis for Obesity and Cancer. *Front Genet.* 2020; 11: 559138.
47. Martin JF, LeDuc CA, Zhang Y, Stratigopoulos G, Leibel RL. FTO mediates cell-autonomous effects on adipogenesis and adipocyte lipid content by regula-

- ting gene expression via 6mA DNA modifications. *J Lipid Res* 2018;59:1446-1460.
48. Li J, Zhu L, Shi Y, Liu J, Lin L, Chen X. m6A demethylase FTO promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis via mediating PKM2 demethylation. *Am J Transl Res*. 2019;11:6084–92.
 49. Czajkowski P, Patruno EA, Bauer W, Fiedorczuk J, Krasowska U, Moroz M ve ark. The Impact of FTO Genetic Variants on Obesity and Its Metabolic Consequences is Dependent on Daily Macronutrient Intake. *Nutrients*. 2020 Oct 23;12(11):3255
 50. Rivera M, Locke AE, Corre T, Czamara D, Wolf C, Lopez CA ve ark. Interaction between the FTO gene, body mass index and depression: meta-analysis of 13701 individuals. *Br J Psychiatry*. 2017;211(2):70-76.
 51. Mizuno TM. Fat Mass and Obesity Associated (FTO) Gene and Hepatic Glucose and Lipid Metabolism. *Nutrients*. 2018 Nov; 10(11): 1600.
 52. Cheng CF, Ku HC, Lin H. PGC-1 α as a pivotal factor in lipid and metabolic regulation. *Int J Mol Sci* 2018,19:11
 53. José LS, Bernardo JK, Luis RC, Javier V, Francisca SP, Paula M ve ark. PPARGC1A Gene Promoter Methylation as a Biomarker of Insulin Secretion and Sensitivity in Response to Glucose Challenges. *Nutrients*. 2020 Sep; 12(9): 2790.
 54. Daixiu Y, Dingfu X, Qian G, Liming Z. PGC-1 α activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Eat Weight Disord*. 2019 Jun;24(3):385-395

55. Andersen G, Wegner L, Jensen DP, Glumer C, Tarnow L, Drivsholm T ve ark. PGC-1 α Gly482Ser polymorphism associates with hypertension among Danish whites. *Hypertension*. 2005; 45: 565–570
56. Park S, Kim B, Kang S. Interaction Effect of PGC-1 α rs10517030 Variants and Energy Intake in the Risk of Type 2 Diabetes in Middle-aged Adults, *European Journal of Clinical Nutrition* 2017; 71(12), 1442-1448.
57. Bost F, Kaminski L. The metabolic modulator PGC-1 α in cancer. *Am J Cancer Res*. (2019) 9:198–211
58. Garcia EA, King P, Sidhu K, Ohgusu H, Walley A, Lecoœur C ve ark. The role of ghrelin and ghrelin-receptor gene variants and promoter activity in type 2 diabetes. *European Journal of Endocrinology*. 2009; 161 307–315
59. Joatar FE, Qarni AA, Ali ME, Masaud AA, Shire AM, Das N ve ark. Leu72Met and Other Intronic Polymorphisms in the GHRL and GHSR Genes Are Not Associated with Type 2 Diabetes Mellitus, Insulin Resistance, or Serum Ghrelin Levels in a Saudi Population. *Endocrinol Metab* 2017;32:360-369.
60. Li YY, Lu XZ, Yang XX, Wang H, Geng HY, Gong G ve ark. GHRL gene Leu72Met polymorphism and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis involving 8,194 participants. *Front Endocrinol*. 2019;10:559
61. Rivera EA, Llamas-Covarrubias MA, Sánchez-Enríquez S, Martínez-López E, González-Hita M, Llamas-Covarrubias IM. Leu72Met polymorphism of GHRL gene decreases susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *BMC Endocr Disord*. 2020 Jul 22;20(1):109
62. Czajkowski P, Patruno EA, Bauer W, Fiedorczuk J, Krasowska U, Moroz M ve ark. The Impact of FTO Genetic Variants on Obesity and Its Metabolic Con-

- sequences is Dependent on Daily Macronutrient Intake. *Nutrients*. 2020 Oct 23;12(11):3255
63. Younus LA, Algenabi AHA, Abdul-Zhara MS, Hussein MK. FTO gene polymorphisms (rs9939609 and rs17817449) as predictors of Type 2 Diabetes Mellitus in obese Iraqi population. *Gene*. 2017;627:79–84.
 64. Saldaña-Alvarez Y, Salas-Martínez MG, García-Ortiz H, uckie-Duque A, Garcia-Cardenas G, Vicenteno-Ayala H ve ark. Gender-dependent association of FTO polymorphisms with body mass index in mexicans. *PLoS One* 2016; 11: e0145984
 65. Dai J, Ying P, Shi D, Hou H, Sun Y, Xu Z ve ark. FTO variant is not associated with osteoarthritis in the Chinese Han population: replication study for a genome-wide association study identified risk loci. *J Orthop Surg Res*.2018; 13:65
 66. Karoli HC, Stevens CJ, Magnan RE, Harlaar N, Hutchison KE, Bryan AD. Genetic influences on physiological and subjective responses to an aerobic exercise session among sedentary adults. *J. Cancer Epidemiol*. 2012, 1–12 (2012).
 67. Xia W, Chen N, Peng W, Jia X, Yu Y, Wu X ve ark. Systematic Metaanalysis Revealed an Association of PGC-1 α rs8192678 Polymorphism in Type 2 Diabetes Mellitus. *Dis Markers*.2019;2019:2970401.
 68. Jemaa Z, Kallel A, Sleimi C, Mahjoubi I, Feki M, Ftouhi B. The Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) is associated with type 2 diabetes in Tunisian population. *Diabetes Metab Syndr*. 2015;9(4):316–319.
 69. Fanelli M, Filippi E, Sentinelli F, Romeo S, Fallarino M, Buzzetti R. The Gly482Ser missense mutation of the Peroxisome Proliferator-activated receptor

gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) gene associates with reduced insulin sensitivity in normal and glucose-intolerant obese subjects. DisMarkers. 2005;21:175–180

