

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**TIP 2 DİYABETİK HASTALAR İLE DİYABETİ OLMAYAN
KARDEŞLERİNDE TCF7L2 VE PPAR- γ GENLERİNDEKİ
GENETİK POLİMORFİZMİN PCR-RFLP METODU İLE
ARAŞTIRILMASI**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

Dr. Kemal TÜRKER

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Numan TAMER**

ISPARTA - 2011

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasındaki katkılarından dolayı tez danışmanım SDÜ Rektör Yardımcısı ve Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları BD Başkanı saygıdeğer Hocam Prof. Dr. M. Numan TAMER'e, huzurlu ve güzel bir çalışma ortamı sağlayan İç Hastalıkları ABD Başkanı Prof. Dr. M. Cem KOÇKAR'a, İç Hastalıkları ihtisasım boyunca bilgi ve becerilerini benden esirgemeyen sevgili hocalarım Prof. Dr. M. Tuğrul SEZER'e, Prof. Dr. Ercan TUNÇ'a, Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR'e, Prof. Dr. Mehmet İŞLER'e, Prof. Dr. Ülkü SARITAŞ'a Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN'e, Doç. Dr. Z. Dilek AYDIN'a, Yrd. Doç. Dr. E. Güçhan ALANOĞLUN'a, Yard. Doç. Dr. Murat KOÇER'e, Yrd. Doç. Dr. Banu Kale KÖROĞLU'na, genetik çalışmalardaki desteğinden dolayı Prof. Dr. Sıtkı ÖZTAŞ'a, tezimin hazırlanışında katkısından dolayı sevgili diyabet hemşiremiz Emel Hanım'a, İç Hastalıkları eğitimim sırasında her şeyi paylaşabildiğim değerli asistan arkadaşlarım ve İç Hastalıkları ailesinin diğer çalışanlarına, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşime ve aileme, tezimin son aşamalarında bana moral motivasyon sağlayan yeni doğan biricik kızım Elif Gizem'e teşekkürümü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kan Glukoz Düzeyinin Ayarlanması	3
2.2. İnsülin Etki Mekanizması	3
2.3. Diabetes Mellitus Tanısı	4
2.4. Tip 2 Diyabet Patogenezi.....	5
2.4.1. Tip 2 Diyabet Patogenezinde Beta Hücre Disfonksiyonu.....	5
2.4.2. Tip 2 Diyabet Patogenezinde İnsülin Direnci.....	6
2.4.3. Tip 2 Diyabet Patogenezinde Lipotoksisite	7
2.5. Tip 2 DM Genetiği.....	8
2.6. İnsülin Direnci Ölçümü	9
2.7. İnsülin Sekresyon Ölçümü	10
2.8. PPAR - γ	10
2.8.1. PPAR- γ Etki Mekanizması.....	11
2.8.2. PPAR- γ Etkileri	12
2.8.3. PPAR- γ Polimorfizmleri.....	14
2.9. Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (TCF7L2) Geni ve Polimorfizmi	16
3. MATERYAL VE METOD	19
3.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Seçimi	19
3.2. Kandan DNA İzolasyonu	19
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	20
3.4. PPAR- γ Pro12Ala ve TCF7L2 Polimorfizmlerinin Belirlenmesi için Gerçekleştirilen PCR Çalışmaları	22

3.5. PCR ürünlerinin %3'lük Agaroz Jelde kontrol edilmesi	23
3.6. Restriksiyon Enzim Kesimi	23
3.7. İstatistiksel Yöntem	27
4. SONUÇLAR.....	28
4.1. Hastaların Demografik Özellikleri.....	28
4.2. Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (TCF7L2) Gen rs12255372 Polimorfizm Genotipleri Açısından Değerlendirme	29
4.3. Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (TCF7L2) Gen rs12255372 Polimorfizm Alel Frekansları.....	30
4.4. Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (TCF7L2) Gen rs7903146 Polimorfizm Genotipleri Açısından Değerlendirme	31
4.4. Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (TCF7L2) Gen 7903146 polimorfizm Alel Frekansları	32
4.5. Diyabetik Olmayan Kardeşlerde TCF7L2 gen rs12255372 Polimorfizminin Diğer Parametrelerle İlişkisinin Değerlendirilmesi	33
4.6. Diyabetik Olmayan Kardeşlerde TCF7L2 gen rs7903146 Polimorfizminin Diğer Parametrelerle ilişkisinin Değerlendirilmesi	34
5. TARTIŞMA.....	36
ÖZET	40
ABSTRACT.....	41
KAYNAKLAR.....	42

KISALTMALAR

AKŞ	: Açlık Kan Şekeri
AMPK	: AMP tarafından aktive olan protein kinaz
ATP-az	: Adenozin trifosfataz
Bç	: Baz çifti
BGT	: Bozulmuş glukoz toleransı
DCCT	: The Diabetes Control and Complications Trial
DM	: Diabetes Mellitus
GLP-1	: Glukagon Like Peptid-1
GLUT	: Glukoz için taşıyıcı proteinler
HECT	: Hiperinsülinemik Öglisemik Klemp Testi
HOMA-B hücre	: Homeostasis model assesement B-cell
HOMA-IR	: Homeostasis Model Assesment Insulin Resistance
IRS-1	: İnsülin reseptör substrate 1
İD	: İnsülin direnci
MODY	: Maturity-Onset Diabetes of the Young
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI3-kinaz	: Fosfotidil inositol 3-kinaz
PPAR-γ	: Peroksizom proliferator tarafından aktive edilen reseptör- γ
PPRE	: Peroxisome proliferator response element
RXR	: Retinoid X reseptör
SNP	: Single Nucleotide Polymorphisms
SYA	: Serbest yağ asiti
TCF7L2	: Transkripsiyon faktör 7 benzeri 2
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör-alfa
TURDEP	: Türkiye Diyabet Hipertansiyon Obezite ve Endokrinoloji Hastalıkları Prevelans Çalışması
TZD	: Tiazolinedion
T1DM	: Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	: Tip 2 Diabetes Mellitus
UKPDS	: United Kingdom Prospective Diabetes Study
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Hastaların demografik özellikleri	29
Tablo 2. TCF7L2 Gen rs12255372 polimorfizminin genotip frekansları.....	29
Tablo 3. TCF7L2 Gen rs12255372 polimorfizminde grupların dominant ve resesif modele göre genotip dağılımları	30
Tablo 4. TCF7L2 geni rs12255372 polimorfizminin allel frekansları.....	31
Tablo 5. TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin genotip frekansları	31
Tablo 6. TCF7L2 gen rs7903146 polimorfizminin dominant ve resesif modele göre genotip dağılımları.....	32
Tablo 7. TCF7L2 geni rs7903146 polimorfizminin allel frekansları.....	33
Tablo 8. Diyabeti olmayan kardeşlerin TCF7L2 gen rs12255372 polimorfizmi ile antropometrik ve biyokimyasal parametreler açısından değerlendirilmesi	34
Tablo 9. Diyabeti olmayan kardeşlerin TCF7L2 gen rs7903146 polimorfizmi ile antropometrik ve biyokimyasal parametreler açısından değerlendirilmesi	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İnsülin ve insülin like growth faktörü (IGF-1) sinyal ağı	4
Şekil 2. PPAR'ların genel yapısı	11
Şekil 3. PPAR'ların RXR ile heterodimer yapısı oluşturmaları ve hedef gen ifadesinin gerçekleşmesi	12
Şekil 4. PPAR- γ gen polimorfizmleri	15
Şekil 5. PPAR Pro12Ala polimorfizminin genotip analiz jel görüntüsü	26
Şekil 6. TCF7L2 rs12255372 geninin genotip analiz jel görüntüsü	26
Şekil 7. TCF7L2 rs7903146 geninin genotip analiz jel görüntüsü	27

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Diabetes mellitus (DM) insüline karşı direnç ve/veya insülin eksikliği nedeniyle oluşan ve hiperglisemi ile karakterize bir metabolizma hastalığıdır (1). Yüksek morbidite ve mortalite hızı, yüksek tedavi harcamaları ve iş gücü kaybı nedeni ile hem hastaya hem de topluma büyük yük getirmesinden dolayı diyabet önemli bir sağlık sorunudur (2-5). Prevalansı dünyada ve ülkemizde giderek artmaktadır (6, 7). Dünyada 2000'li yıllarda 171 milyon olarak tahmin edilen DM'li hasta sayısının 2030'lu yıllarda 366 milyona ulaşacağı varsayılmaktadır (8). Türkiye'de yapılan TURDEP çalışmasına göre 2000 yılında DM prevalansı %7,2 iken 2010 yılında %13,3'e yükselmiştir. DM vücuttaki tüm sistemleri etkileyebilen kronik bir hastalıktır (9). Son dönem böbrek yetmezliğinin, travmaya bağlı olmayan alt ekstremitte amputasyonlarının, erişkinlerde görülen körlüklerin en önemli nedenidir. Ayrıca diyabet, felçlerin ve koroner arter hastalıklarının en önemli hazırlayıcısıdır (10, 11). Diyabetin ne yazık ki ülkemizde teşhisinin geç olması, bireyin hastalığından habersiz yaşaması ve diyabet konusundaki bilgisizliğinin nedeni ile hastalar komplikasyonlara erken yakalanmaktadır (12). Diyabet Kontrolü ve Komplikasyonları Çalışması (DCCT) ile İngiltere Prospektif Diyabet Çalışması (UKPDS) gibi çalışmalar DM kontrolü ile komplikasyonlarda azalma sağlanabileceğini göstermişlerdir. Diyabetin en önemli iki formu Tip 1 (T1DM) ve Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) olmakla beraber hastalık prevalansının yaklaşık %90-95'ini T2DM oluşturmaktadır (10). T2DM patogenezinde periferik dokularda (kas, karaciğer, yağ) oluşan insülin direnci ve pankreas B hücresinden salınan insülinin sekresyon bozukluğu rol alır (13-16). Bu bozukluklar DM patogenezinde heterojen bir rol almakla birlikte, DM gelişimi genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkmaktadır (17). Metabolik sendrom (abdominal obezite, hipertansiyon, dislipidemi, insülin direnci), sedanter yaşam ve aile öyküsü DM gelişim riskini arttırmaktadır (18, 19). Genetik olarak insülin sekresyon bozukluğu ve insülin direncine yatkın kişilerde çevresel faktörlerin eklenmesi ile zamanla DM gelişmektedir (20). Nadir monogenik DM formları dışında T2DM çoğunlukla poligeniktir (20). DM patogenezinde rol alan insülin direnci, insülin sekresyonu, glukoz transportu gibi olaylarda rol alan proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyon ve polimorfizminler DM'nin genetik temelini oluşturur (20).

Peroksizom proliferator tarafından aktive edilen reseptör- γ (PPAR- γ) ve transkripsiyon faktör 7 benzeri 2 (TCF7L2) genlerindeki polimorfizminler T2DM'nin genetik patogenezinde sıkça suçlanan genetik varyantlardan bazılarıdır (14, 18, 20-23). Bu çalışmada aile öyküsü yönünden zengin T2DM'li hastalar ve onların DM'li olmayan kardeşleri ile sağlıklı kontrol grubunun TCF7L2 ve PPAR- γ gen polimorfizminlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

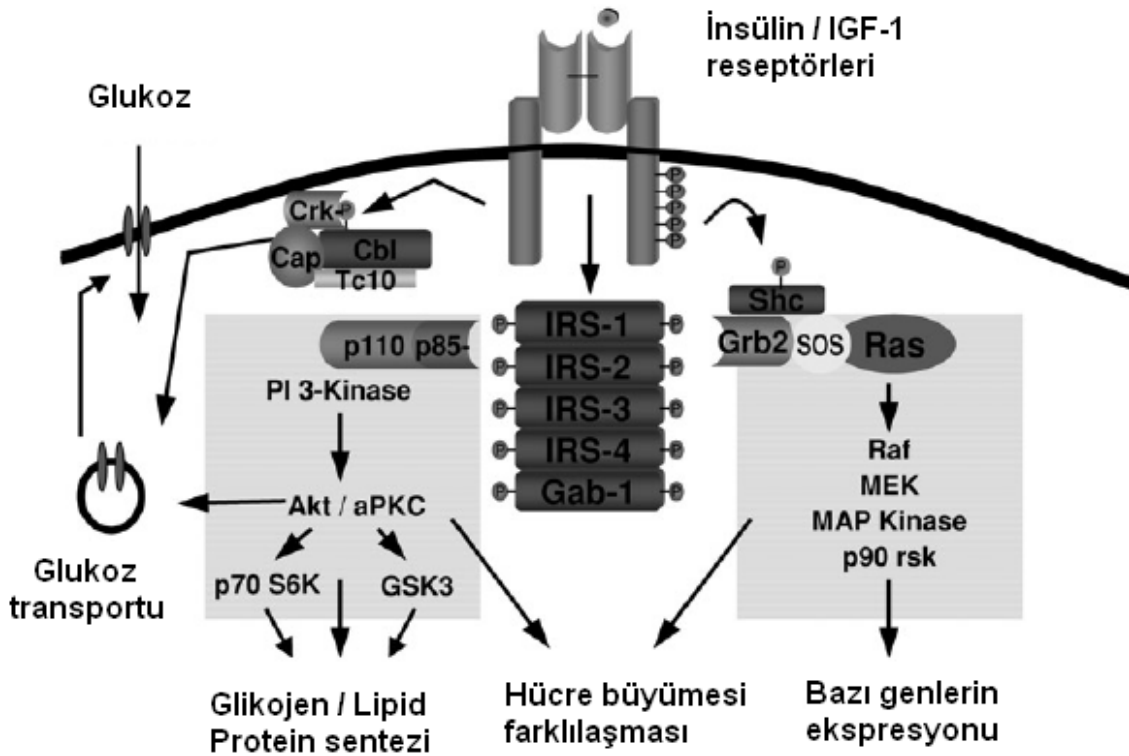
2.1. Kan Glukoz Düzeyinin Ayarlanması

Beslenme ve açlığa rağmen sağlıklı bireylerde plazma glukoz seviyesi 70-120 mg/dl arasında seyretmektedir (24). Bu sıkı kontrolün ayarlanmasında başlıca iki mekanizma rol alır. Bunlar dolaşıma glukoz girişi ve/veya periferik dokular tarafından glukozun dolaşımdan alınarak kullanılmasıdır. Birinci mekanizmada hepatik glukoz üretimi, barsaktan glukoz emilimi ve periferik dolaşıma verilmesi olurken, ikinci aşamada periferik yağ ve iskelet kas dokusu önemli rol oynamaktadır (25). Kas, yağ ve karaciğer gibi dokularda glukoz girişi ve depolanması insülin tarafından düzenlenir, fakat beyin, böbrek ve eritrositlerde insülinin glukoz metabolizması üzerine etkisi yoktur (24). İnsülin, glukoz kullanımının yanı sıra hem bazal hem de glukagonun stimüle ettiği hepatik glukoz üretimini inhibe eder, böylece açlıkta kan glukoz düzeyinin primer regülatörü olarak görev yapar. İnsülin ayrıca kas, karaciğer ve yağ dokuda lipogenezi, glikojen ve protein sentezini stimüle ederek, hücre büyümesini ve farklılaşmasını uyararak anabolik hormon olarak rol alır (24, 26). Hücrelerin hemen hepsinin metabolizmasında glukoz gereklidir. Hücre membranları glukoz gibi polar moleküllere geçirgen olmadıkları için bu tür maddelerin hücre içerisine girmesi taşıyıcı proteinler ile olmaktadır (27). Memeli hücrelerinde sodyum glukoz co-transporter ve kolaylaştırılmış glukoz transporter olmak üzere iki tür glukoz taşıyıcısı bulunmaktadır. Sodyum glukoz co-transporter ince barsak ve böbrek proksimal tubulilerinde ATP-az aracılığı ile konsantrasyon gradientine karşı taşıma işlemi yapar. Kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcıları bütün hücrelerde vardır ve gradient konsantrasyonu yönünde kolaylaştırılmış difüzyon ile enerji gereksinimi olmaksızın glukoz için taşıyıcı proteinler (GLUT) aracılığı ile glukoz transportu sağlanmaktadır. Dokulara göre farklı spesifik glukoz taşıyıcıları vardır. GLUT-1 uyarıya ihtiyacı olmayan pankreas beta hücreleri gibi dokularda bulunurken, GLUT-4 hormonal (insülin) ve iskelet kas kontraksiyonu gibi mekanik uyarılara yanıt veren dokularda bulunur (28).

2.2. İnsülin Etki Mekanizması

İnsülinin etkisi hedef hücre membranında yer alan reseptöre bağlanması ile başlamaktadır (Şekil 1). İnsülin reseptörü iki alfa ve iki beta alt ünite içeren, tirozin

kinaz reseptörünün bir alt ailesine ait olan bir tetramerik proteindir. İnsülinin hücre membranındaki reseptörün alfa subünitesine bağlanması beta subünitesinde bulunan üç adet tirozin artık molekülünü fosforile ederek tirozin kinaz aktivitesi kazandırır. Tirozin artık molekülü protein kinaz veya protein fosfotaz enzimlerini aktifleştirerek hücre içi biyolojik etkiye tetikleme rolü oynar. İnsülin reseptöründe en önemli madde insülin reseptör substrate 1 (IRS-1)'dir. IRS-1 tirozin fosforile olduktan sonra p85 ve Grb-2 adlı en az iki tip proteine bağlanır. P85, fosfotidil inositol 3-kinaz (PI3-kinaz) aracılığı ile GLUT'ların yardımı ile hücre içine glukoz girişini artırır. Grb2; Sos ve Ras proteinleri aracılığı ile MAP kinaz aktivitesini artırır böylece insülin hücre büyüme ve farklılaşma üzerine etki gösterir (28-30).



Şekil 1. İnsülin ve insülin like growth faktörü (IGF-1) sinyal ağı (Kaynak 24'ten alınmıştır)

2.3. Diabetes Mellitus Tanısı

Diyabet tanısı için son şekillenen kriterlere göre aşağıdaki bulgulardan her hangi birinin olması diyabet tanısı koydurur (31).

- En az 8 saat açlık sonrası bakılan açlık plazma glukozunun ≥ 126 mg/dl olması

- 75 gram ile yapılan oral glukoz tolerans testi (OGTT) testinde 2. saat plazma glukozunun ≥ 200 mg/dl olması
- Hiperglisemi veya hiperglisemik krizin semptomlarını gösteren bir kişide rastgele bir zaman diliminde bakılan plazma glukozunun ≥ 200 mg/dl olması
- Uygun laboratuvar koşullarında bakılan HbA1c düzeyinin $\geq \%6,5$ üzerinde olması

2.4. Tip 2 Diyabet Patogenezi

2.4.1. Tip 2 Diyabet Patogenezinde Beta Hücre Disfonksiyonu

Pankreatik B hücreleri insülin sekrete ederek hücrel enerji kaynaklarının depolanmasını ve metabolizmasını kontrol etmektedir. β hücre disfonksiyonu; insülin sekresyonundaki pulsatilite ve kinetiklerindeki bozukluk, insülindeki kantitatif veya kalitatif anormallikleri ve β hücre kaybını içerir. İnsülin sekresyonu, hepatik glukoz üretiminin regülasyonu için gerekli olduğu düşünülen 11-14 dakikalık periyodisite gösteren osilatuar pulsasyonlar ile gerçekleşir, ayrıca özellikle yemek sonrası büyük patlamalar halinde insülin salınımı olur. Sağlıklı bireylerde bifazik insülin salınımı, ilk 30 dakikadaki erken faz ve postprandial hiperglisemik dönemdeki 1-2 saat süren geç fazı kapsar (32-34). Tip 2 diyabetiklerde karakteristik β hücre defekti, glukozla indüklenen insülin sekresyonuna ilk faz cevabının kaybıdır, ikinci faz da daha az derecede olmak üzere bozulmuştur. İnsülin sekresyonunun ilk fazındaki azalma diyabetin erken dönemlerinde hatta prediyabetik dönemde gösterilmiştir (35, 36). Pulsatilite ve glukozla ilk faz insülin yanıtındaki bozulmanın kısmen glukokinaz ve iyon kanallarında fonksiyon bozukluğu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (37). Tip 2 Diyabette başlangıçta olay glukoz intoleransı için genetik bir predispozisyonudur. Glukoz intoleransının gelişip gelişmeyeceği konusunda hayat tarzı ve çevresel faktörler de belirleyici olmaktadır (16). Bir çok çalışmada erken dönemde hiperglisemi gelişmeden önce insülin resistansının olduğu gösterilmiştir (38-40). Ancak pek çok çalışmada T2DM oluşumunda β hücre disfonksiyonunun da kritik rol oynadığı ispatlanmıştır. Beta hücre disfonksiyonu T2DM'de her zaman vardır, muhtemelen hiperglisemiden önce, erken dönemde gelişir (41, 42). İnsülin resistansı bozulmuş glukoz toleransından (BGT) diyabete progresyonda çok az değişir. Bunun aksine B

hücre fonksiyonu büyük değişime uğrar. Hastalığın erken fazlarında, açlık insülin düzeylerinde ve oral glukoz insülin cevabında insülin rezistansına rağmen glisemi normal sınırlarda tutan bir artış, bunu takiben kan şekeri 140 mg/dl'yi geçtikten sonra azalma göstermektedir. Önceleri insülindeki artışın; hastalığın erken safhasında insülin rezistansının önemini gösterdiği düşünülmekte idi, ancak son zamanlarda bu ilgi BGT'dan aşikar diyabete geçiş dönemi ile insülindeki azalmanın (β hücre yetersizliği) keşişmesi ile ilginin yine bu noktaya çekilmesine sebep olmuştur (43, 44). Zamanla kötüleşen β hücre fonksiyonuna paralel olarak oral antidiyabetiklere tedavi cevabı azalır. Kabul gören yaklaşım β kitlesinde kayba yol açan patojenik faktörlerin faal hale geldiği şeklindedir (45). Pankreas β hücreleri içindeki amiloid birikimlerinin T2DM patogeneğinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda amiloid parçacıklarının toksik olduğu ve hücre ölümüne yol açtığı, insanlarda da amiloid içeren adacıklarda proinsülin mRNA azalmasının çok sınırlı düzeyde olduğu saptanmıştır(46, 47).

2.4.2. Tip 2 Diyabet Patogeneğinde İnsülin Direnci

İnsülin direnci (İD), ekzojen veya endojen insüline karşı normal biyolojik yanıtın bozulması olarak tanımlanır (48). İnsülin direncinin glukoz intoleransı, T2DM, hipertansiyon, dislipidemi, ateroskleroz ve çeşitli kanserlerle olan birlikteliğini gösteren çalışmalar vardır (49-51). Prospektif çalışmalar, insülin direncinin T2DM gelişiminden 10-20 yıl önce bulunduğunu ve T2DM gelişiminin en önemli ön bulgusu olduğunu göstermektedir. İnsülin direncinde insülinin karaciğer, kas ve yağ dokusundaki etkilerine olan direnç sonucu kanda hiperglisemi meydana gelir. Beta hücre fonksiyonunda hata olmadığı koşullarda, insülin direnci hiperinsülinemi ile kompanse edilebilir. T2DM'nin oluşması için insülin sekresyonunda ilave bozukluklar gereklidir (38, 52). İnsülin direnci obezitede sık rastlanan bir durum olmasına rağmen OGTT'si normal sağlıklı kişilerin %25'inde de insülin direnci saptanmıştır (53). İnsülin direnci prereseptör düzeyde (anormal beta hücre salgı ürünleri, dolaşan insülin antikorları vb), reseptör düzeyinde (reseptör sayısında azalma, reseptör mutasyonları) ve postreseptör düzeyde (tirozin kinaz aktivitesinde azalma, reseptör sinyal sisteminde bozukluklar, glukoz transportunda azalma vb) gelişebilir. İnsülin direncinin gelişiminde reseptör ve özellikle postreseptör düzeydeki bozukluklar daha önemli ve sıklıkla karşımıza çıkan

durumlardır (54). Özellikle visseral yağ dokusu, subkutan yağ dokusuna göre insülin direnci gelişiminde önemli role sahiptir (55).

2.4.3. Tip 2 Diyabet Patogenezinde Lipotoksisite

Yağ dokusundaki insülin direnci, insülin tarafından lipolizin baskılanmasının azalması ile karakterizedir, bu da dolaşımdaki serbest yağ asiti (SYA) düzeyinde artmaya neden olur. İnsülinin SYA'leri üzerine olan baskılayıcı etkisi obez, insüline dirençli ve T2DM'li kişilerde bozulmuştur (56, 57). Obez kişilerde plazma SYA düzeyi artmıştır. Plazma SYA'lerindeki artışlar iskelet kası ve karaciğerde insülin direncini doza bağımlı arttırmaktadır. Ancak obez kişilerin sadece %20'sinde T2DM gelişmektedir. O halde genetik olarak yatkın kişilerde, obeziteye bağlı yükselen serbest yağ asitleri T2DM geliştirmektedir (48). Yağ dokusundan salınan artmış SYA'leri karaciğerde okside olur ve trigliseridlerin hepatik sentezi artar. SYA'leri glikoneogenezde rol alan piruvat karboksilaz ve fosfoenolpiruvat karboksilazı uyarır, ayrıca glukoz-6-fosfotaz uyarısı ile karaciğerden glukoz çıkışını artırır (58). Karaciğer ve iskelet kasında lipid molekülleri olan açıl-KoA, diaçilgliserol birikimi ile aktive olan protein kinaz C, IRS-1'in serin-treonin yoluyla fosforile ederek insülinin etkisini inhibe edebilir (59). Hücre içi lipid depolanması sadece kas ve karaciğerde değil pankreas adacık hücrelerinde de gelişir. SYA'leri insülin salgılanması 6 saat süreyle uyarır ancak 24-48 saat sonra inhibe etmektedir. SYA'leri uzun zincirli CoA düzeyini arttırarak insülin sinyallerini etkilemektedir. Lipotoksisite böylece beta hücre salgı yetmezliğini arttırmaktadır (48). Yağ dokusunda SYA'nden başka salınan adipositokinler (TNF alfa, adiponektin, IL-6, leptin, rezistin vb) obezite ve diyabet gelişiminde bir çok mekanizmada rol almaktadır (26). Adiponektin, insülin duyarlılığında artışa yol açan yağ dokusuna özel bir proteindir (60). Yüksek bazal plazma seviyeleri T2DM gelişim riskinin azalması ile ilişkilidir (61). Adiponektin AMP tarafından aktive olan protein kinaz (AMPK) yoluyla kas ve karaciğerde yağ asid oksidasyonunu, kas ve karaciğerde glukoz transportunu artırır (37, 62). Bazı çalışmalarda adiponektin ile tedavi edilen farelerde insülin direncinin azaldığı, yağ asidi ve enerji tüketimi ile ilişkili genlerin ekspresyonunun arttığı, obezitede adiponektin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (63). Yağ dokusu Tümör nekroz faktör alfa (TNF alfa), interlökin-6 (IL-6), transforme edici büyüme faktörü beta, C reaktif protein, monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) i

içeren çok sayıda proinflatuar molekülleri üretir ve bu moleküller obezitede artar (64-66). TNF alfa IRS-1'in serin fosforilasyonuna yol açarak insülin direncine katkıda bulunur (64). TNF alfa ile tedavi edilmiş hücrelerde IRS-1'in serin fosforilasyonu aspirin tedavisi ile engellenmektedir. İki hafta boyunca yüksek doz aspirin ile tedavi edilen dokuz T2DM'li hastada önemli derecede açlık glukozunda düşme saptanmıştır (67). IL-6 lipolizi, SYA'ni artırır ayrıca hepatositlerde insülin direncine sebep olur (68, 69).

2.5. Tip 2 DM Genetiği

İnsülin resistansının, bozulmuş insülin sekresyonunun ve genetik faktörlerin T2DM gelişimine katkısı yıllardır bilinmektedir. Destekleyici bulgular olarak aile içi kalıtım birikimi, çift yumurta ikizlerinden ziyade tek yumurta ikizlerinde yüksek T2DM konkordans oranı ve bazı etnik gruplarda yüksek T2DM sıklığı sayılabilir (70-72). T2DM aile öyküsü olan bir bireyde T2DM gelişme riski, aile öyküsüne sahip olmayan bireye göre 2.4 kat daha yüksektir (73). Birinci derece akrabasında T2DM bulunan kişilerin %15-25'inde diyabet ya da bozulmuş glukoz toleransı gelişir. Anne ya da babası T2DM olan bir kişide, seksen yaşına kadar T2DM gelişme riski %38 olarak hesaplanmıştır (74). Anne ve babası da diyabet olan bir bireyde ise, altmış yaşında T2DM gelişme prevalansı %60 olarak bulunmuştur (75). Geçmiş yıllarda diyet ve yaşam tarzı iyi bilinen ve değişik bölgelerde yaşayan genetik açıdan benzer toplumlarda T2DM sıklığının değişiklik gösterdiği saptanmıştır (76). Bu yüzden T2DM; çevresel risk faktörleri ve genetik faktörlerin birleşimi ile oluşan kompleks bir hastalık olarak görülmektedir. T2DM'nin %25 ile %75'inin genetik faktörlere atfedilebileceği tahmin edilmektedir (77). T2DM genetiği monogenik ve poligenik olmak üzere ikiye ayrılır. Monogenik form nadir olarak görülen tek bir gendeki mutasyonlar sonucu oluşan, fenotip/genotip oranı 1'e yakın olan, çevresel faktörlerden etkilenmeyen formdur. Monogenik formlara örnek olarak Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) , aşırı insülin rezistansının genetik sendromları ve mitokondrial diyabet sayılabilir (78). Poligenik T2DM formu ise pek çok farklı genin ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkan T2DM formudur. Temelde etiyopatogenezi heterojendir ve poligenik T2DM'yi belirleyen, tüm vakaları kapsayan bir gen saptanmamıştır (48). İnsülin direnci ve Beta hücre defektinin hangisinin genetik komponentinin ön planda olduğu,

hangisinin patogeneizde ön planda olduğu tartışmalıdır. Bugünkü konsepsiyonda insülin direnci öncelikli ağırlıklı genetik bir patogenetik faktör gibi görülmektedir ancak son yıllarda beta hücre salgı defektinin de önemli, genetik ağırlıklı patogenetik faktör olduğuna dair çalışmalar vardır (48, 79). T2DM'deki fonksiyonel aday genler; insülinin etkisine katılan (insülin reseptörü, insülin reseptör substratları (IRS), PI-3 Kinaz, glukoz transportu ve metabolizması) genler, insülin sekresyonuna katılan (GLUT2, glukokinaz, iyon kanalları, preproinsülin, β hücre transkripsiyon faktörleri) genler, obezite (santral sinir sistemi mediyatörleri, leptin ve leptin reseptörü, peroksizom proliferatör aktiflenmiş reseptör gama (PPAR- γ)) genleridir (80). PPAR- γ geninde 12. kodonda prolin-alanin değişimi (Pro12Ala), T2DM ile ilişkisi gösterilmiş ilk genetik polimorfizmlerden biridir (78, 81, 82).

2.6. İnsülin Direnci Ölçümü

Periferik insülin direncini belirlemede Hiperinsülinemik Öglisemik Klemp Testi (HECT); “altın standart” olarak kabul edilir. Bu test; hiperinsülinemik bir ortamda normoglisemi sağlamak amacıyla verilen glikozun, kullanılma hızını saptamaya dayanır. Sağlıklı bireylerde glikoz kullanım hızı 4.7-8.8 mg/kg/dk olarak bulunmuştur. Periferik insülin rezistansı olan bireylerde ise glikoz kullanım hızı azalmıştır. İnvaziv olması, özel ekipman ve bu konuda deneyimli kişilerin varlığı gerektiğinden, genellikle rutinde değil, araştırma amacıyla kullanılan çok değerli bir testtir (83). HECT testi dışında insülin rezistansı ölçümü için insülin, glukoz ve c-peptid oranı, insülin tolerans testi ve homeostasis model assesment insulin resistance (HOMA-IR) testi gibi kullanılan testler vardır (84, 85). HOMA-IR testi 1985'ten beri özellikle büyük populasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmıştır. HOMA-IR hesaplanırken açlık glukoz ve açlık insülin düzeylerinin bilinmesi gerekmektedir. Şu formül kullanılmaktadır.

$$\text{HOMA-IR} = [\text{açlık insülin (IU/mL)} \times \text{açlık glukoz (mmol/L)}] / 22.5$$

(mg/dl' yi mmol/L'ye dönüştürmek için glukoz değeri 18 ile bölünür) (86-88).

2.7. İnsülin Sekresyon Ölçümü

İnsülin sekresyonu değerlendirmesi için homeostasis model assesement β -cell (HOMA- β hücre) veya 30. dakika insülinogenik indeks ölçümü kullanılabilir (89). HOMA β -cell açlık fazında çalışılırken, insülinogenik indeks (30. dakika) 75 gr OGTT ile çalışılır. İnsülinogenik indeks (30. dakika) OGTT esnasında erken faz insülin sekresyonunu değerlendirmek için iyi bilinen bir yöntemdir (90, 91). M. Fukushima ve arkadaşlarının normal glukoz toleranslı, bozulmuş glukoz toleranslı ve diyabetik toplam 684 Japon üzerinde yaptığı çalışmada glukoz toleransı arttıkça insülin rezistansı yüksek (artmış HOMA-IR), bazal insülin sekresyon seviyeleri (azalmış HOMA β -cell) ve erken faz insülin sekresyonu azalmış (azalmış insülinogenik indeks) olarak bulunmuştur (89). Bir başka çalışmada ise insülin sensitive indeksi (ISI) ve düzeltilmiş inkremental insülin cevabı (CIR) kullanılmıştır.

HOMA β cell: $20 \times \text{açlık plazma insülin düzeyi } (\mu\text{U/ml}) / (\text{açlık plazma glukoz düzeyi } (\text{mmol/L}) - 3,5)$

İnsülinogenik indeks (30. dakika): $(\text{İnsülin } 30 - \text{İnsülin } 0) / (\text{glukoz } 30 - \text{glukoz } 0)$ (89-92).

ISI = $\frac{10,000}{\dots}$

$\sqrt{([\text{açlık plazma glukozu} \times \text{açlık plazma insülini}] \times [\text{ortalama OGTT glukozu} \times \text{ortalama OGTT insülini}])}$

CIR = $\frac{(100 \times 30 \text{ veya } 40. \text{ dakika insulin})}{([\text{30 veya } 40. \text{ dakika glukozu}] \times [\text{30 veya } 40. \text{ dakika glukozu} - 3.89])}$ (93).

2.8. PPAR - γ

PPAR- γ , kromozom 4q15 üzerine lokalizedir. Hücre metabolizmasında rol alan önemli organellerden biri de peroksizomdur. Peroksizom enzimleri, kolesterolün ve gliserolipidlerin biyosentezi, reaktif oksijen türevlerinin metabolizması, yağ asidi oksidasyonu gibi pek çok katabolik ve anabolik enzimatik yolakta görev almaktadır. Peroksizom proliferasyonuna yağ asitlerinin mikrozomal ve peroksizomal oksidasyonunda rol alan genlerin transkripsiyonunda artış, kolesterol ve trigliserid düzeylerinde düşüşü içeren lipid metabolizması değişikliklerinin eşlik ettiği gözlenmiştir. Issemann ve Green tarafından 1990'da tanımlanmış ve peroksizom

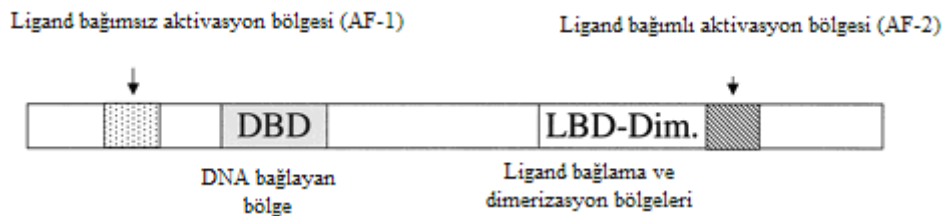
çoğalması yapan bir grup sentetik ajanın nükleer reseptör grubu içinde bir reseptörü aktive edebileceği bildirilmiştir. Bu reseptörlere peroksizom proliferatörleri tarafından aktive olan reseptör (PPAR) adı verildi. Daha sonra bu reseptörlerin 3 tipi tanımlandı; PPAR- α , PPAR- γ ve PPAR- β (94, 95). PPAR α , β ve γ aynı izotipe sahip olmalarına rağmen farklı genlerden kodlanırlar. Yapıları birbirlerine çok benzerlikler gösterse de farklı biyolojik etkinlikleri vardır (96, 97). PPAR- α peroksizom çoğalması, lipid metabolizması, adiposit farklılaşması, ateroskleroz ve inflamasyonda rol alır. Özellikle lipid metabolizmasında önemli rolü vardır ve yağ asitlerine karşı en yüksek afiniteyi gösteren PPAR'dır. Antiinflamatuvar etkinliği vardır ve fibrat grubu hipolipidemik ilaçlar PPAR- α 'nın sentetik ligandıdır (98). PPAR- β ; kolesterol transportu, kolonda karsinogenez, yara iyileşmesi, kaslarda yağ asidi beta oksidasyonunda rol alır. PPAR- γ kolon, barsak dokuları yanı sıra en çok adipoz dokuda ifade edilir. Lipid ve glukoz metabolizması, adiposit farklılaşması ve monosit-makrofaj farklılaşmasında rol alırlar ve oral antidiyabetik ilaç olan tiazolinedionlar (TZD) tarafından aktive edilir (97, 99).

2.8.1. PPAR- γ Etki Mekanizması

PPAR- γ nükleer reseptörlere yapısal özellikleri bakımından benzerlik gösterir (100). Üç kısımdan oluşur.

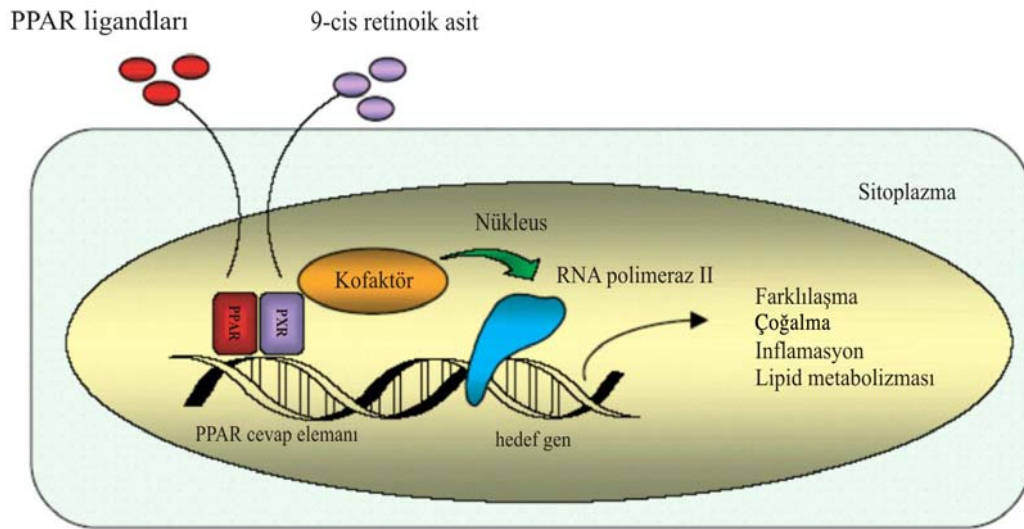
1. Ligand bağımsız transkripsiyon aktivasyon fonksiyonunu (AF-1) taşıyan N-terminal A/B bölgesi
2. DNA bağlayan bölge
3. Ligand bağımlı aktivasyon fonksiyonu (AF-2) gösteren ligand bağlayıcı C terminal bölgesi

(Şekil 2).



Şekil 2. PPAR'ların genel yapısı. (Kaynak 91'den değiştirilerek alınmıştır)

PPAR- γ aktive olduktan sonra retinoid X reseptör (RXR) ile heterodimerik yapıyı oluşturur (96). RXR ligand ile aktive edilen bir transkripsiyon faktörüdür. Heterodimerik yapı ile nükleus içine geçiş sağlanır ve bundan sonra hedef genin promotor bölgesinde yer alan PPAR yanıt elemanına (PPRE) bağlanırlar. PPRE ile DNA'ya bağlanma gerçekleşir. Reseptör, liganda bağlı iken koaktivatör adı verilen proteinlerle kompleks oluşturabilir. Hedef genlerin transkripsiyonu koaktivatör aracılığıyla uyarılmaktadır. Koaktivatörlerin histon asetil transferaz aktivitesi bulunmaktadır. Histon asetil transferaz aktivitesi ile kromatin içerisindeki histonlar asetillenir ve bazik aminoasitlerin pozitif yükleri nötralize olur. Böylece histonlar ile DNA arasındaki iyonik etkileşim bozulmakta ve sıkı kromatin yapı gevşemektedir. Oluşan bu yapıya RNA polimeraz II yerleşerek transkripsiyonu başlatır(101). Bu süreç hedef genin transkripsiyonunu aktive eder (99) (Şekil 3).



Şekil 3. PPAR'ların RXR ile heterodimer yapısı oluşturmaları ve hedef gen ifadesinin gerçekleşmesi (Kaynak 90'dan değiştirilerek alınmıştır)

Bütün PPAR'lar yapısal açıdan benzer özellik ve aynı PPRE dizisine sahip olmalarına rağmen farklı fizyolojik etki gösterirler. Bunun sebebi dokularda farklı izoformların olması ve farklı ligandlarla aktive olmalarıdır.

2.8.2. PPAR- γ Etkileri

PPAR- γ adipoz hücre farklılaşması, glukoz homeostazı ile lipid depolanmasında görev alır ve bu olaylarla ilgili birçok genin transkripsiyonunu kontrol eder.

- **Adipoz Doku Üzerine Etkisi**

PPAR- γ lipid hücrelerinin oluşumu ve fonksiyonunda önemli rol alır. Adiposit diferansiyasyonunda diğer transkripsiyon faktör ailesinden olan SREBP (sterol regulatory element binding protein) ve C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) ile birlikte çalışır ve yağ dokusunda fazlaca eksprese edilir (102). Preadipositden adiposit hücrelerine dönüşümü sağlar. PPAR- γ geni etkisizleştirilmiş (knockout) farelerde adipoz doku gelişmemiş, heterozigot farelerde ise adipoz doku zayıflamıştır (103-105). İnsan preadiposit kültürlerinde de PPAR- γ aktivatörü olan TZD ile diferansiyasyon sağlanmıştır (106). PPAR- γ , yağ asidi metabolizması ve transportunda görev alan adiposit yağ asidi bağlayan protein (FABP), yağ asidi transport protein (FATP), fosfoenolpirüvat karboksikinas, yağ asidi translokaz (CD36), Açıl-CoA sentaz, lipoprotein lipaz gibi pek çok enzimin gen transkripsiyonunu düzenler (107). Yağ asidi taşıyıcısı CD36'nın düzeyini arttırarak lipidlerin hücre içine taşınmasını sağlarken, ATP-bağlayan kaset protein A1'i (ATP binding cassette protein A1, ABCA1) indükleyerek lipitin hücre dışına çıkarılmasına sebep olur (108).

- **İnsülin Direnci Üzerine Etkisi**

TZD'ler insülin duyarlılığını arttırır. PPAR- γ 'nın insülin duyarlılığı üzerine etkisinin olduğu, TZD'lerin bu reseptörün aktivatörü olduğunun anlaşılması ile ortaya çıkmıştır (109). PPAR- γ 'nın insülin duyarlı glukoz kullanımında önemli doku olan iskelet kasında bulunmamasına rağmen insülin direncinde önemli rol oynaması yağ dokusunun önemini gösterir. Yağ dokusu olmayan farelerde TZD'lerin antidiyabetik etkilerine direnç olması bu bulguyu destekler (110). PPAR- γ 'nın insülin duyarlılığı üzerine olan etkisi birkaç yoldan olmaktadır.

- 1) Adipokin Salınımının Düzenlenmesi: PPAR- γ adiposit kökenli hormonların transkripsiyonunu düzenler. Rezistin kastaki insülin direncini arttıran bir adipokindir. TZD'ler rezistin salınımını azaltır (100). TNF- α lipoprotein lipazı inhibe edip lipolizi arttırarak, yağ asit düzeyini arttırarak ve insülin reseptör sinyal iletimini bozarak insülin direncine sebep olan diğer bir adipokindir (100). TZD'ler TNF- α düzeyini ve TNF- α 'nın IR ve IRS-1 üzerine olan negatif etkilerini azaltır (40).

- 2) Glukoz Girişinin Arttırılması: PPAR- γ GLUT-4 taşıyıcılarını arttırarak glukozun hücre içine girişini arttırır (100).
- 3) Kortizol Yapımının Azaltılması: PPAR- γ 11 beta-hidroksisteroid dehidrogenaz tip I (11 beta-HSD I) ekspresyonunu azaltarak, insülin direncinde etkili olan lokal kortizol üretimini azaltır (98).
- 4) Serbest Yağ Asidi Akışının Düzenlenmesi: SYA düzeyi insülin direncinde önemli role sahiptir. PPAR- γ , SYA metabolizmasındaki enzimlerin ekspresyonunu düzenleyerek SYA'lerinin adipositlerde depolanmasını sağlar (100).

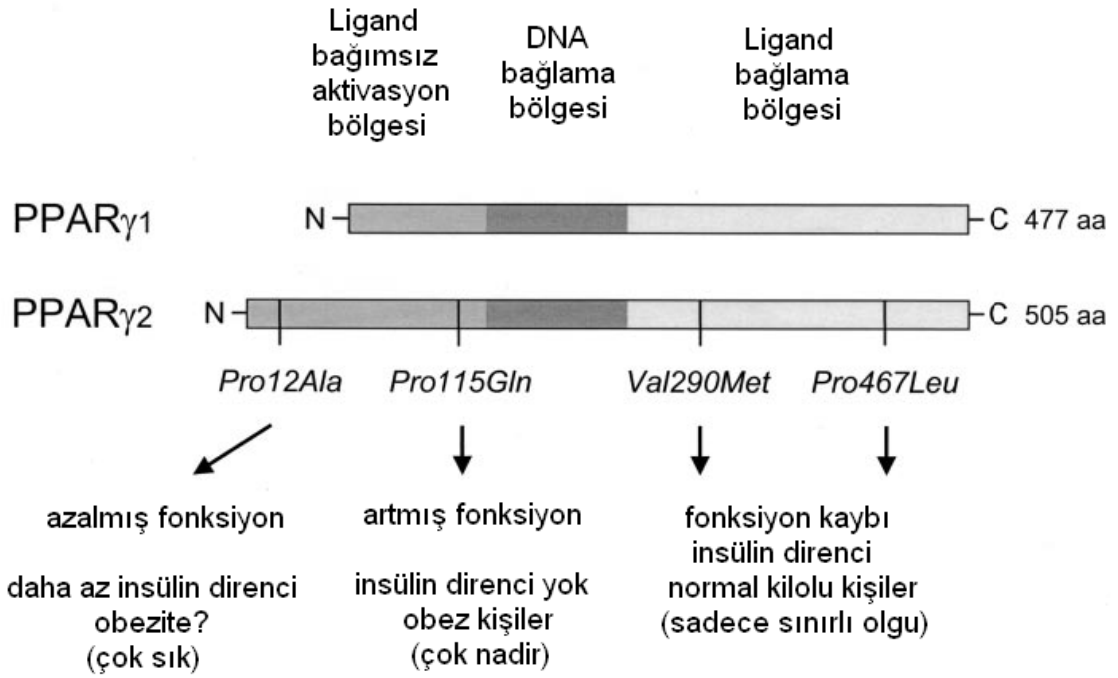
- **Diğer Dokular Üzerine Etkisi:**

PPAR- γ endotelin-I salınımını azaltarak, düz kaslarda kalsiyum kanal blokajı yaparak kan basıncı üzerine olumlu etki yapar (98). PPAR- γ makrofaj aktivasyonunu ve T lenfositleri inhibe ederek, inflamatuvar sitokinlerin [TNF- α , interlökin-1 (IL-1), interferon- γ (IFN- γ)] salınımını azaltarak antiinflamatuvar etkide de bulunmaktadır (111). Glukoz ve lipid düzeylerine olan etkileri, makrofajlar üzerine olan etkileri ile kardiyovasküler sistem üzerine de etkilidir (96, 112).

2.8.3. PPAR- γ Polimorfizmleri

PPAR- γ 'nın PPAR- γ 1 ve PPAR- γ 2 olmak üzere iki izoformu vardır (113). İkisinin de ligand-bağımlı ve ligand-bağımsız transkripsiyonel aktiviteleri vardır. İnsülin hem PPAR- γ 1 hem de PPAR- γ 2'nin ligand bağımsız aktivitelerini uyarabilirken, obezite ve beslenme faktörleri ise yalnızca PPAR- γ 2'nin insan yağ dokusundaki ekspresyonunu etkiler (114). PPAR- γ 2 amino terminalinde ilave olarak 28 aminoaside sahiptir ve bu da bu izoformun 5-10 kat daha aktif olmasına yol açmaktadır. Bu transkripsiyon faktöründeki 2 nadir mutasyon (Pro467Leu, Val290Met) aşırı insülin rezistansı, T2DM ve hipertansiyon ile birliktelik göstermektedir (23). Alman popülasyonunda tanımlanmış diğer bir aminoasid varyantı (Pro115Gln) obez (BMI \geq 29 kg/m²) bireylerde saptanmıştır (115). En sık görülen PPAR- γ genetik varyantı mutasyon PPAR- γ 2'de tanımlanan Pro12Ala polimorfizmidir (73, 114, 116). Bu polimorfizm insanlarda PPAR- γ 2 genin N-terminal bölgedeki ilave 30 amino asidlik bölümünde

meydana gelir. Ekzon B (ekzon 2), kodon 12' de CCA'dan GCA'ya missense mutasyon sonucu oluşur.



Şekil 4. PPAR- γ gen polimorfizmleri (PPAR- γ 2'nin Pro12Ala polimorfizmi dışında tüm mutasyonlar her iki izoformu da etkileyebilir. Dominant negatif mutasyonlar ligand bağlayan bölgede bulunur. DNA bağlayan bölgede henüz mutasyon tanımlanmamıştır) (Kaynak (73))

Pro12Ala allelin sıklığı etnik farklılıklar göstermektedir, Latin Amerikalılar'da %23, Beyaz ırkta %12, Amerikan yerlilerinde %10, Japonlarda %4, Afrika kökenli Amerikalılar'da %3 sıklıkta bildirilmiştir (73, 117). Birçok çalışmada Ala12 alelinin T2DM riskinde azalmaya yol açma eğiliminde olduğunu göstermiştir (21, 117-120). Binden fazla orta yaşlı ve yaşlı Finlide PPAR- γ geninde Pro12Ala polimorfizmi insülin duyarlılığında iyileşme ile birlikte (114). Bu çalışmanın aksine bir meta-analizde obezlerdeki (zayıflarda değil) homozigot Ala12 bulunanlarda vücut kitle indekslerinde artış olduğu gösterilmiştir (121). Tip 2 diyabetiklerin birinci derece yakınlarında, diyabet açısından aile öyküsü olmayanlara göre PPAR- γ 2 Pro12Ala polimorfizminin daha düşük olduğu bulunmuştur (122). Tip 2 diyabetiklerin Pro12Ala allel taşıyan çocuklarında insülin duyarlılığının daha fazla olduğu bildirilmiştir (123). Tip 2 diyabetiklerin birinci derece yakınlarının katıldığı benzer bir çalışmada, Pro12Ala polimorfizmi sadece obez olan grupta, artmış insülin duyarlılığı ile ilişkili bulunmuştur (124). Tip 2 diyabetiklerin yakınlarının katıldığı diğer bir çalışmada ise, Pro12Ala polimorfizmi ile metabolik sendrom bileşenleri olan boy-kilo indeksi, serum glukoz ve

trigliserid düzeyleri, kan basıncı ile ilişkili bulunmuş, fakat diyabet gelişimi üzerine etkisi gösterilememiştir (125). Japon ve beyaz ırkta Ala12 alleli ile korunma daha yüksek bulunmuştur ancak nedeni belli değildir. Ala12 varyantının diğer genetik ve çevresel faktörler ile etkileşip korumaya yol açacağı şeklinde açıklama yapılabilir (114, 120).

2.9. Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (TCF7L2) Geni ve Polimorfizmi

TCF7L2, kromozom 10q25 üzerine lokalizedir (126). TCF polimorfizmi primer olarak beta hücreyi etkileyen diyabetle ilişkili bir gen dir (127, 128). Yapılan birçok çalışmada da TCF7L2 gen polimorfizmi ile T2DM arasında birliktelik bulunmuştur (129, 130). TCF7 polimorfizmi taşıyan homozigotlarda DM riski 2,41 kat heterozigotlarda 1,45 kat artmıştır (131). TCF7L2'nin normal görevleri ve diyabet predispozisyonuna nasıl yol açtığı konusunda çok az şey bilinmektedir. MODY'e yol açan genler hepatik nükleer faktör 1 alfa (HNF1A) olarak bilinen TCF1 ve hepatik nükleer faktör 2 alfa (HNF2A) olarak bilinen TCF2 genleridir (132). TCF7 gen ürünü olan insan T hücre transkripsiyon faktör-4 (TCF-4), Glukagon Like Peptid-1 (GLP-1) regülasyonunda görev alan Wnt sinyalizasyonda rol alır (133). Wnt proteinleri sistence zengin glikoproteinler olup nematottan insana evrimsel olarak korunmuş sinyal molekülleridir. Başlattıkları sinyal mekanizmaları, hücrelerin çoğalması, başkalaşması, göçü ve hücre polaritesinin düzenlenmesi gibi gelişim süreçlerinde önemli rol oynarlar (134). Wnt sinyal iletiminin canlılarda 3 farklı yol izlediği saptanmıştır. Bunlar; Wnt/ β -katenin, Wnt/PCP (Planar cell polarity) ve Wnt/Kalsiyum sinyal yollarıdır (135). TCFL geninin transkripsiyonel aktivasyonunu yaparak β Katenini artırır. Bu durum wnt sinyalizasyon yolağını bozarak GLP-1 salgılayan endokrin hücrelerinin ekspresyonunun bozulmasına yol açar. Enteroendokrin hücrelerde bulunan GLP-1 kodlamasını yapan proglukagon geninin transkripsiyon faktörü TCF-4'tür. Dominant negatif TCF-4 proglukagon m-RNA ekspresyonu ve GLP-1 sentezinde azalmaya yol açar (136). GLP-1'in glukoz hemostazı üzerine önemli etkileri vardır. GLP-1 insülin sekresyon ve yapımını uyararak, gastrik boşalmayı ve glukagon salınmasını baskılayarak, periferik insülin duyarlılığını artırır (137). İtron 3 (DG10S478)'te mikrosatellit marker'ı ve T2DM ile birliktelik gösteren 5 tane SNP [single nucleotide polymorphisms (SNPs)] bulunmuştur. T2DM ile en sık ilişkilendirilen SNP'ler rs12255372 ve rs7903146'tür

(126). Diyabet önleme programında takip edilen bozulmuş glukoz toleranslı 3548 kişi yaşam tarzı değişikliği, metformin ile kontrol grubu olarak 3 gruba ayrılmış ve DM gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülen varyantlar (rs12255372 ve rs7903146) incelenmiştir. Üç yıl sonunda TT genotipe sahip rs7903146'lu BGT'lu hastalarda CC genotipe göre DM'ye ilerleme daha çok saptanmıştır. TT genotip azalmış insülin sekresyonu (bozulmuş β hücre fonksiyonu) ile paralellik göstermiştir. İnsülin direnci ile ilişkisiz bulunmuştur. Benzer sonuçlar rs12255372'de de saptanmıştır (129).

TCF7L2 transkripsiyonunun β hücre fonksiyonlarını bozarak diyabete predispozisyon oluşturduğu bilinmekle beraber bunun hangi mekanizmalarla gerçekleştiği tam olarak açıklanamamıştır. Bu mekanizmaları açıklamaya yönelik yapılan bir çalışmada T alleleri insülin sekresyon ve etkisinde azalma, hepatik glukoz üretiminde artış ile ilişkili bulunmuştur. Prospektif olarak yapılan bu çalışmada İsveç grubundaki 1731'i bozulmuş glukoz toleranslı, 5330'u normal glukoz toleranslı kişilerin 22 yıllık takibinde 1422 kişide DM gelişmiştir. CT/TT genotipli SNP rs7903146 ve GT/TT genotipli rs12255372 taşıyan TCF7L2 risk oranı sırayla %45,9 ve 48,5 gibi yüksek oranda bulunmuştur. rs7903146 CT/TT genotip ve rs12255372 GT/TT genotip taşıyıcıları T2DM gelişimi açısından CC and GG genotip taşıyıcılarına göre daha risklidir. Bosna grubunda da (2651 kişi) benzer sonuçlar bulunmuştur. Bu çalışmaya göre TCF7L2 polimorfizminin etkileri:

- Bozulmuş İnsülin Sekresyonu: TCF7L2 polimorfizmine sahip CT/TT genotipliler CC genotiplilere göre daha düşük insulinojenik indekse sahiptir. Arjinine karşı akut insülin cevabında azalma vardır.
- İn kreatin Etkileri: GLP-1 insülin salınımını arttırırken, glukagon salınımını azaltır, Gastrik İntestinal Peptid (GIP) her ikisini birden arttırır. GIP ve GLP-1 gibi intestinal insulin sekretoglar oral glukozdan intravenöz glukozdan daha iyi insülin yanıtı verirler. TCF7L2 polimorfizmleri ile hem oral hem iv glukozda inkreatin cevabında azalma vardır.
- Hepatik İnsülin Rezistansı: TCF7L2, hepatik insülin rezistansı ile ilişkilendirilmiş ancak periferik insülin direnci ile ilişkilendirilmemiştir. Vücut glukoz uptake'i risk olan ve olmayan genotipli TCF7L2 taşıyıcılarında farksız bulunurken, bozulmuş hepatik glukoz üretim

supresyonu nedeni ile endojen glukoz üretimi CT/TT taşıyanlarda CC genotipe göre daha fazla bulunmuştur.

- Vücut Kitle İndeksi (VKİ) ilişkisi: İsveç grubunda VKİ ile ilişki bulunmazken, Bosna çalışmasında TT genotipte VKİ daha düşük bulunmuştur. Leptin seviyeleri ile ilişli bulunmamıştır.
- Hücre Gen ekspresyonunu arttırarak: TCF7L2 pankreatik hücreleri etkileyerek etki gösterir mi? Yedi T2DM'li, 15 non diabetik insan organ donörlerinin pankreatik hücrelerindeki TCF7L2 mRNA düzeyleri ölçülmüştür. Başlangıçta DM'li hastaların pankreas hücrelerinde DM'li olmayanlara göre artmış glukagon ve azalmış insülin salınımı gösterilmiş, mRNA TCF7L2 düzeyleri DM'li olanlarda olmayanlara göre 5 kat fazla bulunmuştur (138).

Hepsi 17 yaş altında tanı almış 6199 Tip 1 DM'li hastada yapılan bir çalışmada rs12255372 ve rs7903146 SNP'leri analiz edilmiştir. TCF7L2 ile Tip 1 DM birlikteliğine dair bir kanıt bulunamamıştır (139). Şaşırtıcı olarak bir çalışmada TCF7L2 varyasyonlu T2DM'lilerde azalmış VKİ tespit edilmiştir (140). Başka bir çalışmada ise SNP rs12255372'nin homozigot T/T alleli taşıyanlar glukozu akut insülin cevabı düşüklüğü ve artmış bozulmuş tokluk glukozu ile ilişkili, adipoz doku ölçümü ve insülin sensitivitesi ile ilişkisiz bulunmuştur. rs7903146 herhangi bir metabolik ölçümle ilişkilendirilememiştir (22). TCF7L2'nin hücre farklılaşması ve büyümesindeki rolünden ve Wnt/ β Katenin yolağının onkogenik etkilerinden yola çıkılarak yapılan bir çalışmaya göre TCF7L2 rs12255372'nin familyal meme kanseri ile ilişkilendirilebileceği bildirilmiştir (141). Sonuç olarak TCF7L2 enteroinsüler aks üzerinden GLP-1 aracılığı ile insülin salınımını ve yapımını azaltarak, pankreas β hücre harabiyetine sebep olarak ve intrinsek β hücre disfonksiyonuna sebep olarak etki gösterir (132).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Seçimi

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Polikliniğine Isparta ve yakın yerleşim yerlerinden müracaat eden Tip 2 diyabetik hastalara diyabet hemşiremiz tarafından bir anket doldurularak hastaların diyabet öyküleri ve aile öyküleri alındı. Bu anketle başvuran hastaların (indeks hastalar) birinci dereceden akrabalarında diyabeti olanlar ve olmayanlar belirlendi. Çalışmamızda 295 Tip 2 diyabet hastasına anket uygulandı ve indeks hastaların birinci dereceden diyabetik akrabaları tekrardan indeks hasta olarak alınmadı. Anketlerden birinci dereceden akrabalarında 3 ve daha fazla T2DM olan aileler belirlendi (**diyabet yönünden zengin aile**). Bu ailelerde en erken Tip 2 diyabet tanısı alan kişinin tanı yaşından 10 yıl daha büyük olduğu halde diyabet geliştirmemiş kişiler (örneğin 41 yaşında tanı alan aile ferdinin 51 yaşında olduğu halde diyabet geliştirmemiş indeks hastanın **kardeşi**) hastanemize çağrılarak diyabetik olmadıkları oral glukoz tolerans testi (OGTT) ile kesinleştirildi. OGTT sırasında 0, 30 ve 120. dk kan şekeri ile insülin (beta hücre fonksiyonu ve insülin direnci ölçümü için) bakıldı. Bu şekilde diyabet gelişimine karşı dirençli olduğu düşünülen 27 kişi bulundu. Bu bireylerin genetik yapılarını ailedeki diğer sağ ve ulaşılabilen diyabetik hastalarinki ile karşılaştırmak için kan örnekleri alındı ve HOMA-IR, HOMA-B cell ile insülinogenik indeks (30. dakika) düzeyleri hesaplandı. Diyabetik hastaların tanısı açlık kan şekeri (AKŞ) ve HbA1c bakılarak kesinleştirildi. Tüm T2DM olan ve olmayan yakınlarının serum lipid profiline bakıldı. Kontrol grubu olarak Isparta çevresinde rastgele sözel olarak kendisinde ve ailesinde DM hikayesi olmayan 20 kişinin AKŞ bakılarak DM olmadığı belirlendi ve genetik analiz için kan örnekleri alındı. Çalışmaya katılan diyabetik ve diyabetik olmayan kardeşlerin antropometrik ölçümleri yapıldı. VKİ değerleri, vücut ağırlığı kg /boy² formülünden hesaplandı. Bel çevresi ölçümü, kot kavsının lateralinden, iliak kristaya uzanan dikey çizginin ortasından geçen çap, ekspiriumda iken ölçüldü (142).

3.2. Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu çalışma için alınan DNA izolasyon kiti (QIAGEN marka DNA izolasyon kiti) protokolüne göre yapıldı. Protokol basamakları aşağıda gösterilmiştir.

- 1) 1,5 ml mikrosantifirüj tüpüne 20 µl Proteinaz K, 200 µl EDTA'lı tüplere alınan kandan, 200 µl Buffer AL (Bağlama Solüsyonu) konuldu. 15-20 saniye vortekslenip, homojenizasyonu sağlandı.
- 2) 56°C'ye ayarlanan su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 3) Karışıma 200 µl etanol eklenip tekrar vortekslenip homojenizasyon sağlandı.
- 4) Eppendorf tüp içinde bulunan karışımın tamamı, 'collection' tüp içine yerleştirilmiş 'filtre' tüpünün içine pipetlendi.
- 5) 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
- 6) Santrifüj sonrasında, örneklerin alt kısmı atılıp ve filtreli kısım yeni bir 'collection' tüpe aktarıldı.
- 7) Filtre tüpünün üzerine 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon (Buffer AW1) eklendi.
- 8) 8.000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
- 9) Santrifüj sonrasında, örneklerin alt kısmı atıldı ve filtreli kısım yeni 'collection' tüpe aktarıldı.
- 10) 500 µl yıkama tamponu (AW2) eklenerek, 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
- 11) Santrifüj bittikten sonra, tüplerin alt kısmında biriken süpernatant uzaklaştırıldı ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- 12) Filtreli tüpler, yeni Eppendorf tüplere yerleştirilerek elüsyon tamponundan (Buffer AE) 200 µl ilave edildi. 8.000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
- 13) Santrifüj sonrasında filtreli tüp atıldı. Eppendorf tüpte kalan genomik DNA ile bir sonraki işleme geçildi.

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, genomik DNA'da dizisi bilinen herhangi bir bölgenin çoğaltılmasına (amplifikasyon) imkan veren in vitro DNA sentezi yöntemidir. PCR, 3 ana basamakta gerçekleşir:

1. Çoğaltılacak çift iplikli DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu
2. Özgül hibridizasyona olanak verecek sıcaklıkta (T_m değerinin 3-5°C altındaki sıcaklık) primerlerin hedef bölgelere bağlanması

3. *Taq* DNA Polimeraz enziminin maksimal aktivite gösterdiği 72°C sıcaklıkta, zincirin primerlerden itibaren uzaması

PCR' da yer alan bileşenler;

1. Çoğaltılacak hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA
2. Çoğaltılacak kalıp DNA'nın komplementeri olacak şekilde seçilmiş yaklaşık 20 bazlık sentetik kısa tek zincirli DNA molekülleri olan oligonükleotid primer çifti
3. *Taq* DNA Polimeraz enzimi.
4. Serbest nükleotidler

Hedef bölgeye spesifik uygun primer çiftinin (ileri ve geri primerler) seçimi oldukça önemlidir. Primerler, 15-20 nükleotid uzunluğundaki sentetik oligonükleotidler olup genomik DNA'daki hedef bölge ile hibridize olabilirler. Primerlerin bağlanma aşamasındaki T_m (erime derecesi) derecesi, PCR reaksiyonu için büyük öneme sahiptir [$T_m=4°C(G+C) + 2°C(A+T)$].

Taq DNA Polimeraz enzimi *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilir, zincirin uzama reaksiyonunu gerçekleştirir, 94°C'de bile aktivitesini kaybetmez, optimal aktivitesini 72°C'de gösterir. *Taq* DNA polimeraz, DNA moleküllerini komplementerleriyle eşleştirir ve onların çoğaltılmasını sağlar. Bu işlemleri yapabilmesi için *Taq* DNA Polimeraz enzimi kofaktör olarak Mg^{2+} iyonlarına ihtiyaç duyar. Bu yüzden PCR için en uygun $MgCl_2$ konsantrasyonunun oluşturulması gerekmektedir. Magnezyum konsantrasyonu fazla olduğunda reaksiyonlarda hatalı eşleşmeler meydana gelirken, eksik olduğunda reaksiyonlarda yeterli miktarda hibridizasyon gerçekleşmemektedir. Primerler ile başlayan çift sarmal oluşumu hedef zincirin DNA polimeraz tarafından dNTP'lerin kullanılarak uzatılmasıyla devam etmektedir. dNTP'ler (ATP, GTP, TTP, CTP) *Taq* DNA polimerazın substratlarıdır. Tek iplikli DNA çift iplikli forma gelir. PCR, 20-40 döngü olarak bu 3 adımın tekrarıyla devam eder ve hedef DNA'nın milyon kopyası oluşturulur.

3.4. PPAR- γ Pro12Ala ve TCF7L2 Polimorfizmlerinin Belirlenmesi için Gerçekleştirilen PCR Çalışmaları

DNA izolasyonu ile elde edilen genomik DNA'dan TCF7L2 (rs12255372 ve rs7903146) ve PPAR- γ (Pro12Ala) Bioer ProGen marka cihaz ile PCR yapılarak ampifikasyon elde edildi. PCR sonrasında PPAR- γ 'ya ait 295 bç. lik, TCF7L2'ye ait 119 ve 113 bç.lik fragmanlar elde edildi.

PCR'da PPAR geni için kullanılan forward (ileri) ve reverse (geri) primer dizileri aşağıda verilmiştir:

PPAR- γ ekzon 2 forward primer: 5'-CAA GCC CAG TCC TTT CTG TG-3'

PPAR- γ ekzon 2 reverse primer: 5'-AGT GAA GGA ATC GCT TTC CG-3'

PCR'da TCF7L2 geni için kullanılan forward (ileri) ve reverse (geri) primer dizileri aşağıda verilmiştir:

rs12255372 genotipleme için kullanılan primer:

Forward primer: 5'- CCC AGG AAT ATC CAG GCA AGG AT -3'

Reverse primer: 5'- CAA ATG GAG GCT GAA TCT GGC A -3'

Rs7903146 genotipleme için kullanılan primer:

Forward primer: 5'- GAG AGC TAA GCA CTT TTT AGG TA -3'

Reverse primer: 5'- CTG ACA TTG ACT AAG TTA CTT GC -3'

PCR işlemi için 25 μ l karışım hazırlandı. Bu karışımın bileşenleri şunlardı:

Steril Distile Su	15,5	μ l
10xPCR (MgCl ₂ içeren)	2,5	μ l
Forward primer (100 μ M)	1	μ l
Reverse primer (100 μ M)	1	μ l
DNA	5	μ l

PCR sonrası elde edilen ürünler %3'lük agaroz jelde yürütülüp görüntülenerek büyüklükleri konfirme edildi. Amplifiye edilen PCR bölgeleri PPAR- γ için 237 bp, TCF7L2 geninin rs12255372 genotipleme için 119 bp ve rs7903146 genotipleme için 113 bp olarak hedeflenmiştir.

3.5. PCR ürünlerinin %3'lük Agaroz Jelde kontrol edilmesi

Üç gram agaroz 90 ml su ve 10 ml 10xTBE (Tris-Borik asit-EDTA; 1x) karışımı içine ilave edildi. Oluşan karışım ısıtılarak eritildi ve 15 μ l Ethidyum Bromür eklenip karıştırıldı. Tamamen eriyik homojen haline gelen jel ılıklaşınca yükleme kuyularını oluşturacak tarağın da takılı olduğu elektroforez transfer kabına döküldü. Jelin polimerleşmesini tamamlanması beklendi. Jel polimerize olunca, tarak çıkarıldı ve agaroz jelin bulunduğu transfer kabı elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı, jelin üzerini kaplayacak şekilde 1xTBE tampon çözeltisi ile dolduruldu. Φ X174 DNA/BsuRI(HaeIII) marker eşliğinde, 6 μ l PCR ürünü + 2 μ l turuncu 6x yükleme boyası [10mM Tris-HCl (pH 7.6), % 0.15 orange G, % 0.03 xylene cyanol FF, % 60 glyserol, 60 mM EDTA; 6x Orange Loading Dye] karışımı kuyucuklara yüklendi. Güç kaynağı 120V\25mA olacak şekilde ayarlandı, jele yüklenen örnekler yaklaşık 30 dakika yürütüldü. Sonuçlar jel görüntüleme, analiz ve dokümantasyon sistemi ile kontrol edildi.

3.6. Restriksiyon Enzim Kesimi

- PCR ile çoğaltılan PPAR- γ geninin 237 bp'lik PCR ürünü, *BsuRI* (*HaeIII*) (Fermentas) restriksiyon enzimi için tek kesim bölgesi içermektedir. Enzim kesim bölgesi aşağıda verilmiştir:

5'-CAAGCCCAGTCCTTTCTGTG

TTTATTCCCATCTCTCCCAAATATTTGGAAACTGATGTCTTGACTCATGGGTG
TATTCACAAATTCTGTTACTTCAAGTCTTTTCTTTTAACGGATTGATCTTTT
GCTAGATAGAGACAAAATATCAGTGTGAATTACAGCAAACCCCTATTCCAT
GCTGTTATGGGTGAAACTCTGGGAGATTCTCCTATTG (A/G)CCCAGAAAG
CGATTCCTTCACT-3'

Enzim kesimi için hazırlanan reaksiyon karışımı:

Steril Distile Su	16,5 µl
BsuRI(HaeIII) Tamponu	3,0 µl
BsuRI(HaeIII) enzimi:	0,5 µl
PCR ürünü	10,0 µl

Karışım 37⁰C'de 2 saat süreyle inkübe edildi.

BsuRI (HaeIII) restriksiyon enzimi A → G transisyonel mutasyonu varsa kesim noktası ortaya çıkacak ve 237 bp'lik PCR ürünü 215 ve 22 bp'lik fragmentlere ayrılacaktır. Eğer mutasyon yoksa kesim oluşmayacak ve 237 bp'lik tek bant elde edilecektir. Eğer olgu heterozigot ise enzim kesimi sonrasında 237, 215, 22 bp'lik üç bant elde edilecektir.

- **PCR ile çoğaltılan TCF7L2 geninin rs12255372 genotiplemesinde** 119 bp'lik PCR ürünü, *BseGI* (Fermantas) restriksiyon enzimi için tek kesim bölgesi içermektedir. Enzim kesim bölgesi aşağıda verilmiştir:

**5'-CCAGGAATATCCAGGCAAGAAT(G/T)ACCATATTCTGATAATTACTCAG
GCCTCTGCCTCATCTCCGCTGCCCCCGCCCCCTGACTCTCTTCTGAGTGC
CAGATTCAGCCTCCATTTG-3'**

Enzim kesimi için hazırlanan reaksiyon karışımı:

Steril Distile Su	16,5 µl
BseGI Tamponu	3,0 µl
BseGI enzimi:	0,5 µl
PCR ürünü	10,0 µl

Karışım 55⁰C'de 2 saat süreyle inkübe edildi.

BseGI restriksiyon enzimi G → T transversiyonel mutasyonu varsa kesim noktası ortadan kalkacak ve 119 bp'lik tek bant görülecektir. Eğer mutasyon yoksa

kesim oluşacak ve 95, 24 bp'lik iki bant elde edilecektir. Eğer olgu heterozigot ise enzim kesimi sonrasında 119, 95, 24 bp'lik üç bant elde edilecektir.

- **PCR ile çoğaltılan TCF7L2 geninin rs7903146 genotiplemesinde** 113 bp'lik PCR ürünü, *RsaI* (Roche) restriksiyon enzimi için tek kesim bölgesi içermektedir. Enzim kesim bölgesi aşağıda verilmiştir:

**5'-GAGAGCTAAGCACTTTTTAGATA(C/T)TATATAATTTAATTGCCGTATGA
GGCACCCCTTAGTTTTTCAGACGAGAAACCACAGTTACAGGGAAGGCAAGTA
ACTTAGTCAATGTCAG**

Enzim kesimi için hazırlanan reaksiyon karışımı:

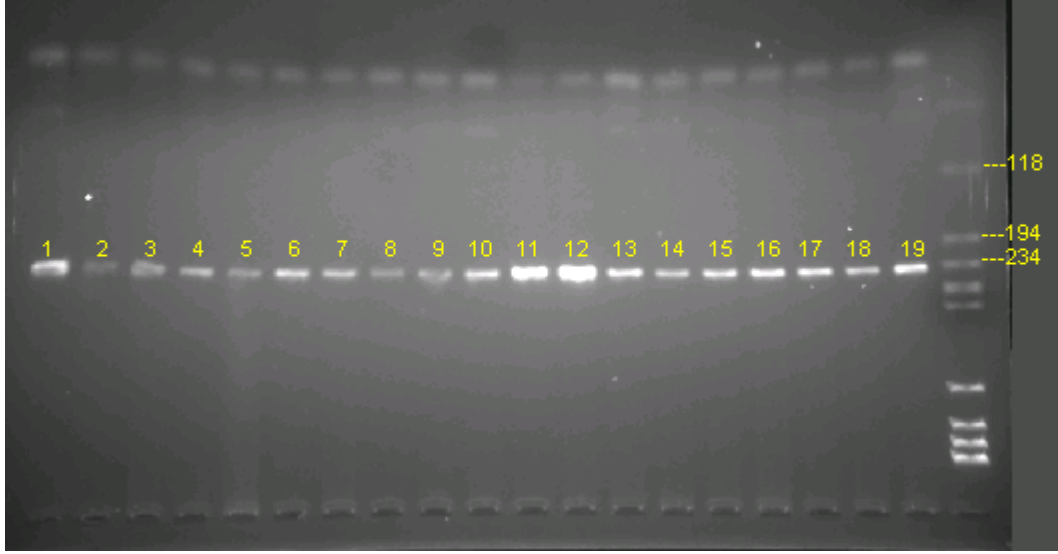
Steril Distile Su	16,5 µl
RsaI Tamponu	3,0 µl
RsaI enzimi:	0,5 µl
PCR ürünü	10,0 µl

Karışım 37⁰C'de 2 saat süreyle inkübe edildi.

RsaI restriksiyon enzimi C → T transisyonel mutasyonu varsa kesim noktası ortadan kalkacak ve 113 bp'lik tek bant görülecektir. Eğer mutasyon yoksa kesim oluşacak ve 89, 24 bp'lik iki bant elde edilecektir. Eğer olgu heterozigot ise enzim kesimi sonrasında 113, 89, 24 bp'lik üç bant elde edilecektir.

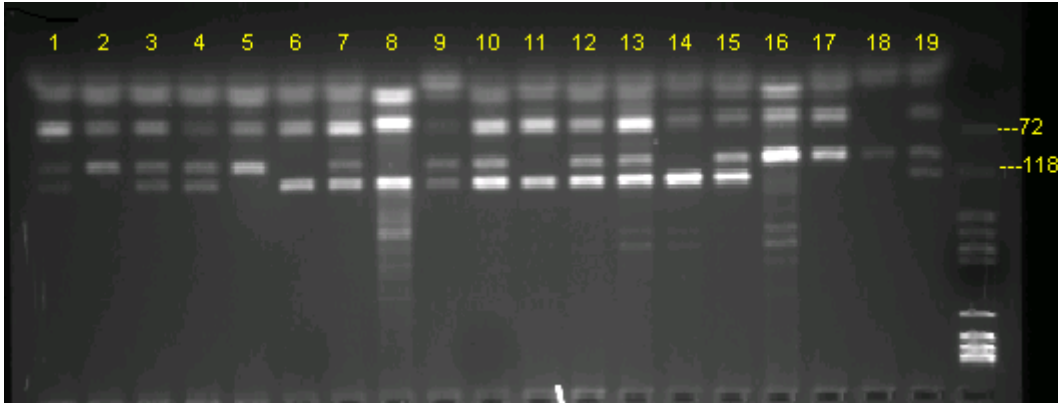
Çalışmamızdaki bazı olgulara ait örneklerin, restriksiyon enzim kesimi ve % 3'lik agaroz jel üzerinde konulmalarından sonra, PPAR-γ genindeki Pro12Ala polimorfizmi ve TCF7L2 genindeki rs12255372, rs7903146 genotiplendirilmeleri şekilde gösterilmektedir (Şekil 5, 6, 7).

(Not: 25, 24 ve 22 bp'lik DNA fragmentleri agaroz jel tekniği ile gösterilememektedir. PAGE tekniği ile gösterilebilir)



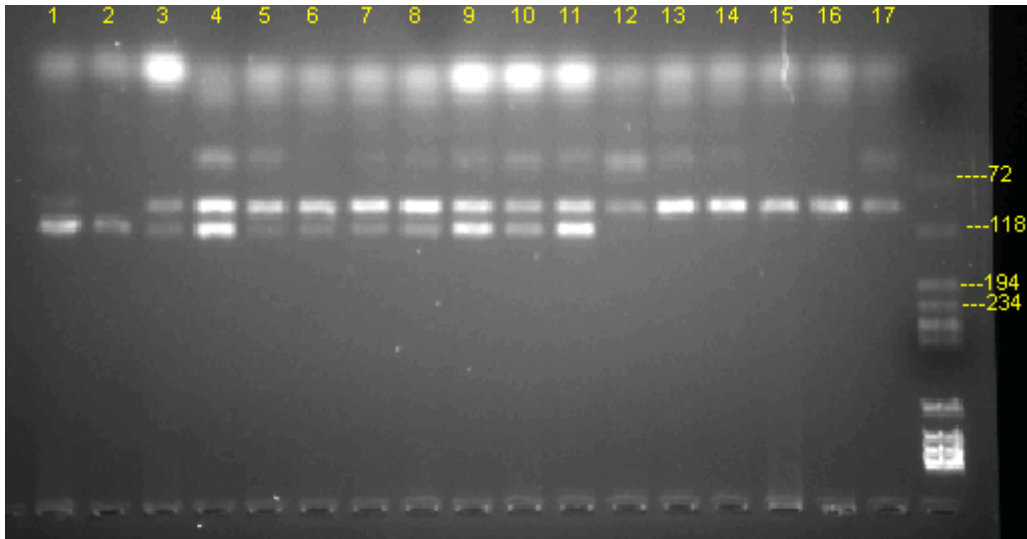
Şekil 5. PPAR Pro12Ala polimorfizminin genotip analiz jel görüntüsü

Sağ tarafta Belirteç DNA [Φ X174 DNA/BsuRI(HaeIII) marker] görülmektedir. Olguların hepsinde 237 bp'lik bant elde edilmiş olup, mutasyon saptanmamıştır.



Şekil 6. TCF7L2 rs12255372 geninin genotip analiz jel görünütüsü

Sağ tarafta Belirteç DNA [Φ X174 DNA/BsuRI(HaeIII) marker] görülmektedir. 6, 8, 11, 14 nolu olgular TT; 1, 3, 4, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 19 nolu olgular GT; 2, 5, 16, 17, 18 nolu olgular GG olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 7. TCF7L2 rs7903146 geninin genotip analiz jel görüntüsü

Sağ tarafta Belirteç DNA [Φ X174 DNA/BsuRI(HaeIII) marker)] görülmektedir. 1 ve 2 nolu olgular TT; 3,4,5,6,7,8,9,10,11 nolu olgular CT; 12,13,14,15,16,17 nolu olgular CC olarak değerlendirilmiştir.

3.7. İstatistiksel Yöntem

Çalışmanın istatistiksel analizi SPSS sürüm 15.0 programı kullanılarak yapıldı. Sürekli değişkenler, aritmetik ortalama \pm standart sapma kategorik değişkenler % olarak ifade edildi. Sürekli değişkenlerin grup karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ise ki-kare testi kullanıldı. İki'den fazla grup ise Kruskal-Wallis testiyle karşılaştırıldı.

4. SONUÇLAR

Çalışmaya katılan kişiler 3 gruba ayrıldı;

Grup 1: Birinci derece akrabalarında 3 veya daha fazla Tip 2 diyabeti olan diyabetik indeks hastalar ve bu hastaların ulaşılabilen diyabetik birinci derece akrabaları **(Bu şekilde diyabet yönünden zengin ailelere ulaşıldı)**

Grup 2: Diyabet yönünden zengin olan bu ailelerde en erken Tip 2 diyabet tanısı alan kişinin tanı yaşından 10 yıl daha büyük olduğu halde diyabet geliştirmemiş indeks hastanın kardeşi (örneğin 41 yaşında tanı alan aile ferдинin 51 yaşında olduğu halde diyabet geliştirmemiş indeks hastanın **kardeşi, bu şekilde diyabet yönünden zengin ailelerde diyabet gelişimine karşı dirençli olduğu düşünülen indeks hastanın kardeşlerine ulaşıldı)**

Grup 3: Kendisi ve birinci derece akrabalarında diyabet öyküsü olmayan kişiler Birinci grubu 28 kişi, ikinci grubu 27 kişi, üçüncü grubu 20 kişi oluşturdu. Bütün gruplar AKŞ, HbA1c, PPAR Pro12A1a polimorfizmi ve TCF7L2 gen polimorfizmleri açısından, 1 ve 2. Grup VKİ, yaş, lipid profili açısından, 2. Grup ayrıca HOMA-IR, HOMA-B cell, 30. dakika insülinogenik indeks açısından değerlendirildi. Üçüncü grup polimorfizm kontrol grubu olması amacı ile belirlendiği için istatistiksel olarak sadece polimorfizm açısından değerlendirildi. Her üç grupta da PPAR Pro12A1a polimorfizmine rastlanılmadı.

4.1. Hastaların Demografik Özellikleri

Grupların cinsiyet ve yaş ortalamaları Tablo 1'de gösterilmiştir. Birinci ve ikinci gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel yönden fark yoktu ($p>0,05$). Birinci ve ikinci gruplar arasında lipid değerleri açısından anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$).

Tablo 1. Hastaların demografik özellikleri

	1. Grup (n:28)	2. Grup (n:27)	P değeri
Yaş ortalaması (yıl)	57 ± 10	59 ± 9	0,540
Cinsiyet (Erkek/kadın)	11/ 17 (%39,3/%60,7)	15/ 12 (%55,6/%44,4)	0,472
VKİ (kg/m²)	31,3 ± 5,0	29,7 ± 4,9	0,248
Total kolesterol (mg/dl)	181,8 ± 37,8	203,4 ± 8,4	0,04
Trigliserid (mg/dl)	185,7 ± 119,5	168,4 ± 104,5	0,571
HDL (mg/dl)	48,7 ± 11,1	51,2 ± 11,1	0,420
LDL (mg/dl)	98,1 ± 31,8	119,7 ± 34,1	0,019

4.2. Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (TCF7L2) Gen rs12255372 Polimorfizm Genotipleri Açısından Değerlendirme

TCF7L2 Gen rs12255372 polimorfizmi genotip dağılımları açısından gruplar arasında bulunan değerler Tablo 2’de gösterilmiştir. Her üç grup TCF7L2 gen rs12255372 genotip dağılımlarına göre karşılaştırıldığında GG, GT ve TT genotipleri yönünden aralarında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$). Ayrıca her üç grup ikili ikili karşılaştırıldıklarında da aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$) (Tablo 2).

Tablo 2. TCF7L2 Gen rs12255372 polimorfizminin genotip frekansları

	1.Grup		2.Grup		3.Grup		P1	P2	P3	P4
	n	%	n	%	n	%				
rs 12255372 GG genotipi	12	42,9	10	37	9	45	0,660	0,883	0,582	0,842
rs 12255372 GT genotipi	12	42,9	13	48,1	10	50	0,694	0,624	0,900	0,871
rs 12255372 TT genotipi	4	14,3	4	14,8	1	5	0,956	0,299	0,281	0,530

p1: 1 ve 2. Grup arası, p2: 1 ve 3. Grup arası, p3: 2 ve 3. Grup arası, p4: tüm gruplar arasındaki anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

Dominant modele göre yani en az bir T alleli (GT+TT, dominant model) taşıyan bireyler ile GG homozigot bireyler hem üç grup arasında hem de gruplar ikili olarak karşılaştırıldı. Birinci ve ikinci grupta mutant kabul edilen GT+TT genotipi 3. gruba göre sayısal olarak daha fazla bulunmasına rağmen gruplar arasında GT+TT genotipine sahip olanlarla GG genotipine sahip olanlar arasında anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0,05$), (Tablo 3).

Resesif modele göre hem üç grup arasında hem de gruplar ikili olarak karşılaştırıldı. Birinci ve ikinci grupta TT genotipi yüksek oranda saptanmasına rağmen GT+GG genotipine sahip olanlar ile TT genotipine sahip olanlar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$), (Tablo 3).

Tablo 3. TCF7L2 Gen rs12255372 polimorfizminde grupların dominant ve resesif modele göre genotip dağılımları

		1.grup		2.grup		3.grup		P1	P2	P3	P4
		n	%	n	%	n	%				
Dominant Model (rs12255372)	GT+TT genotipi	16	57,1	17	63	11	55	0,660	0,883	0,582	0,842
	GG genotipi	12	42,9	10	37	9	45				
Resesif Model (rs12255372)	GT+GG genotipi	24	85,7	23	85,2	19	95	0,956	0,299	0,281	0,530
	TT genotipi	4	14,3	4	14,8	1	5				

p1: 1 ve 2. Gruplar arası, p2: 1 ve 3. Gruplar arası, p3: 2 ve 3. Gruplar arası, p4: tüm gruplar arasındaki anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

4.3. Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (TCF7L2) Gen rs12255372 Polimorfizm Alel Frekansları

TCF7L2 gen rs12255372 polimorfizmi allel açısından incelendiğinde gruplar arasında allel frekans dağılımı Tablo 4'te gösterilmiştir. Her ne kadar 3. grupta diğer gruplara göre G alleli daha çok, T alleli daha az saptansada her üç grub arasında hem G alleli sıklığı ve hemde T alleli sıklığı açısından anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$).

Tablo 4. TCF7L2 geni rs12255372 polimorfizminin allel frekansları

	1.grup		2.grup		3.grup		P1	P2	P3	P4
	n	%	n	%	n	%				
G aleli	36	64,2	33	61,1	28	70	0,713	0,644	0,404	0,715
T aleli	20	35,7	21	38,8	12	30	0,713	0,644	0,404	0,715

p1: 1 ve 2. grup arası, p2: 1 ve 3. grup arası, p3: 2 ve 3. Grup arası, p4: tüm gruplar arasındaki anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

4.4. Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (TCF7L2) Gen rs7903146 Polimorfizm Genotipleri Açısından Değerlendirme

TCF7L2 Gen rs7903146 polimorfizmi genotip dağılımları açısından incelendiğinde gruplar arasında bulunan dağılım Tablo 5'te gösterilmiştir. Her üç grup TCF7L2 gen rs7903146 genotip dağılımlarına göre karşılaştırıldığında CC, CT ve TT genotipleri yönünden aralarında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$). Ayrıca her üç grup ikili ikili karşılaştırıldıklarında da aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$), (Tablo 5).

Tablo 5. TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin genotip frekansları

	1.grup		2.grup		3.grup		P1	P2	P3	P4
	n	%	n	%	n	%				
rs7903146 CC genotipi	9	32,1	10	37	9	45	0,703	0,364	0,582	0,662
rs7903146 CT genotipi	18	64,3	16	59,3	11	55	0,701	0,517	0,770	0,807
rs7903146 TT genotipi	1	3,6	1	3,7	0	0	0,979	0,393	0,384	0,688

p1: 1 ve 2. grup arası, p2: 1 ve 3. grup arası, p3: 2 ve 3. grup arası, p4: tüm gruplar arasındaki anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

Dominant modele göre yani en az bir T alleli (CT+TT, dominant model) taşıyan bireyler ile CC homozigot bireyler hem üç grup arasında hemde gruplar ikili olarak karşılaştırıldı. Birinci ve ikinci gruplarda mutant kabul edilen CT+TT genotipi sayısal

olarak daha fazla olmasına rağmen gruplar arasında CT+TT genotipine sahip olanlarla CC genotipine sahip olanlar arasında anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0,05$), (Tablo 6).

Resesif modele göre hem üç grup arasında ve hemde gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında 1. ve 2. Grupta TT genotipi yüksek oranda saptanmasına rağmen CT+CG genotipine sahip olanlar ile TT genotipine sahip olanlar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$) (Tablo 6).

Tablo 6. TCF7L2 gen rs7903146 polimorfizminin dominant ve resesif modele göre genotip dağılımları

		1.grup		2.grup		3.grup		P1	P2	P3	P4
		n	%	n	%	n	%				
Dominant Model (rs 7903146)	CT+TT genotipi	19	67,9	17	63	11	55	0,703	0,364	0,582	0,662
	CC genotipi	9	32,1	10	37	9	45				
Resesif Model (rs 7903146)	CT+CC genotipi	27	96,4	26	96,3	20	100	0,979	0,393	0,384	0,688
	TT genotipi	1	3,6	1	3,7	0	0				

p1: 1 ve 2. grup arası, p2: 1 ve 3. grup arası, p3: 2 ve 3. grup arası, p4: tüm gruplar arasındaki anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

4.4. Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (TCF7L2) Gen 7903146 polimorfizm Alel Frekansları

TCF7L2 gen rs7903146 polimorfizmi allel açısından incelendiğinde gruplar arasındaki allel frekans dağılımı Tablo 7'de gösterilmiştir. Üçüncü grupta T allel sıklığı daha az tespit edilmesine rağmen her üç grup arasında hem C aleli sıklığı ve hemde T aleli sıklığı açısından anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p> 0,05$), (Tablo 7).

Tablo 7. TCF7L2 geni rs7903146 polimorfizminin allel frekansları

	1.grup		2. grup		3.grup		P1	P2	P3	P4
	n	%	n	%	n	%				
C aleli	36	64,2	36	66,6	29	72,5	0,729	0,309	0,501	0,594
T aleli	20	35,7	18	33,3	11	27,5	0,729	0,309	0,501	0,594

p1: 1 ve 2. grup arası, p2: 1 ve 3. grup arası, p3: 2 ve 3. grup arası, p4: tüm gruplar arasındaki anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

4.5. Diyabetik Olmayan Kardeşlerde TCF7L2 gen rs12255372 Polimorfizminin Diğer Parametrelerle İlişkisinin Değerlendirilmesi

İkinci gruptaki (diyabetik olmayan kardeşler) heterozigot veya homozigot mutasyonu olan (en az bir T alleli, GT+TT, dominant model) ile mutasyonu olmayan (GG homozigot) bireyler genotip ve diğer parametrelerle ilişkisi açısından incelendi. Heterozigot veya homozigot mutasyonu olan 17 hasta ile mutasyonu olmayan 10 hasta arasındaki çeşitli faktörler karşılaştırıldığında; açlık kan şekeri ve HbA1c mutasyonu olmayanlarda anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0,009$, $p=0,014$). Ayrıca insülinin bazal, 30. dakika ve 120. dakika düzeyleri mutasyonu olmayan grupta anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,017$, $p=0,005$). HOMA-IR düzeyinde mutasyonu olmayan grupta mutasyonu olanlara göre anlamlı olarak yüksekti ($p:0,002$) (Tablo 8). Lipid parametreleri ve insülin sekresyon yeteneğini gösteren parametreler açısından iki grup arasında anlamlı farklılık bulunamadı.

Tablo 8. Diyabeti olmayan kardeşlerin TCF7L2 gen rs12255372 polimorfizmi ile antropometrik ve biyokimyasal parametreler açısından değerlendirilmesi

	Mutasyon (+) (GT+TT genotipleri) n:17	Mutasyon (-) (GG genotipi) n:10	P
Yaş (yıl)	61 ± 10	55 ± 7	0,152
Cinsiyet(E/K)	9(%52,9)/8(%47,1)	6(%60)/4(%40)	0,726
BMI (kg/m ²)	29,3 ± 5,5	30,4 ± 3,9	0,327
AKS0 (mg/dl)	86,4 ± 16,3	102,2 ± 9,7	0,009
AKS30 (mg/dl)	151,9 ± 28,3	171,0 ± 18,9	0,067
AKS120 (mg/dl)	109,4 ± 37,8	123,9 ± 43,1	0,380
İnsülin0 (µU/ml)	5,1 ± 3,6	18,1 ± 18,3	0,001
İnsülin30 (µU/ml)	38,9 ± 24,1	75,8 ± 53,7	0,017
İnsülin120(µU/ml)	28,3 ± 24,3	79,5 ± 53,1	0,005
HBA1C (%)	5,5 ± 0,1	5,7 ± 0,2	0,014
T.kolesterol (mg/dl)	204,8 ± 39,7	201,0 ± 38,0	0,940
Trigliserid (mg/dl)	135,8 ± 60,4	223,9 ± 140,2	0,228
HDL –Kol. (mg/dl)	52,0 ± 11,6	49,9 ± 11,6	0,615
LDL- Kol. (mg/dl)	124,8 ± 32,4	111,0 ± 36,9	0,669
HOMA-IR	1,2 ± 1,0	4,6 ± 5,2	0,002
HOMA-β CELL	117,2 ± 118,3	167,7 ± 143,0	0,114
İnsülin index	14,3 ± 13,3	14,8 ± 8,0	0,384

4.6. Diyabetik Olmayan Kardeşlerde TCF7L2 gen rs7903146 Polimorfizminin Diğer Parametrelerle İlişkisinin Değerlendirilmesi

İkinci gruptaki (diyabetik olmayan kardeşler) heterozigot veya homozigot mutasyonu olan (En az bir T alleli, CT+TT, dominat model) ile mutasyonu olmayan (CC homozigot) bireyler genotip ve diğer parametrelerle ilişkisi açısından incelendi. Heterozigot veya homozigot mutasyonu olan 17 hasta ile mutasyonu olmayan 10 hasta arasındaki çeşitli faktörler karşılaştırıldığında; İnsülinin 30. dakika ve 120. dakika düzeyleri mutasyonu olmayan grupta anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p=0,031, p=0,014). Trigliserid düzeyi mutasyon olan grupta mutasyonu olmayan gruba göre anlamlı olarak daha düşüktü (p=0,04), (Tablo 9).

Tablo 9. Diyabeti olmayan kardeşlerin TCF7L2 gen rs7903146 polimorfizmi ile antropometrik ve biyokimyasal parametreler açısından değerlendirilmesi

	Mutasyon (+) (CT+TT genotipleri) n:17	Mutasyon (-) (CC genotipi) n:10	P
Yaş (yıl)	61 ± 9	55 ± 8	0,183
Cinsiyet(E/K)	10(%58,8)/7(%41,2)	5(%50)/5(%50)	0,656
BMI (kg/m ²)	28,7 ± 4,2	31,4 ± 5,7	0,218
AKS0 (mg/dl)	87,4 ± 16,7	100,5 ± 11,1	0,053
AKS30 (mg/dl)	156,1 ± 29,0	163,8 ± 22,3	0,340
AKS120 (mg/dl)	107,4 ± 35,5	127,2 ± 44,9	0,192
İnsülin0 (µU/ml)	9,9 ± 16,1	10,1 ± 5,7	0,068
İnsülin30 (µU/ml)	48,5 ± 49,6	59,5 ± 20,4	0,031
İnsülin120(µU/ml)	32,2 ± 30,0	73,2 ± 53	0,014
HBA1C (%)	5,5 ± 0,1	5,6 ± 0,3	0,373
T.kolesterol (mg/dl)	200,6 ± 41	208,2 ± 35	0,563
Trigliserid (mg/dl)	130,7 ± 72,4	232,5 ± 122,5	0,04
HDL-Kol. (mg/dl)	52,1 ± 11,1	49,8 ± 12,3	0,497
LDL-Kol. (mg/dl)	121,9 ± 32,2	115,9 ± 38,5	0,880
HOMA-IR	2,5 ± 4,4	2,5 ± 1,4	0,114
HOMA-β CELL	160,5 ± 155	98,5 ± 53,5	0,895
İnsülin indeks	14,3 ± 13,7	14,8 ± 6,9	0,215

5. TARTIŞMA

T2DM genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile insüline karşı direnç ve/veya insülin eksikliği nedeniyle oluşan bir metabolizma hastalığıdır. Ebeveyni T2DM olan normoglisemik bireylerde de İD gibi metabolik sendrom bileşenlerinin olabileceği öglisemik hiperinsülinemik klemp tekniği ile yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir (143, 144). T2DM açısından aile öyküsü olan bireylerin aile öyküsü olmayan bireylere göre VKİ, HOMA-IR, LDL, trigliserid değerlerinin daha yüksek olma eğiliminde olduğu bildirilmiştir (145). Çalışmamızda diyabet yönünden zengin ailelerde diyabetik olan bireyler ve diyabetik olmayan kardeşleri arasında VKİ açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır. Diyabetik olmayan kardeşlerde total kolesterol ve LDL düzeyleri diyabetik gruba göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Total kolesterol ve LDL değerlerinin daha düşük olması diyabetik grubun kontrol altında olması ve hiperlipidemi ilaçları kullanmasına (% 56'ı) bağlandı. Diyabetik olmayan kardeşlerde ise hiperlipidemi ilaçlarının kullanılma oranı %17 bulunmuştur. Her ne kadar diyabet gelişimine karşı dirençli olduğunu düşündüğümüz diyabetik olmayan kardeşlerde VKİ ve lipid profil değerlerinde düşüklük beklenmiş olsa da, bu bireylerin aynı aile fertlerinin benzer genetik yapı taşıyor olmaları bu durumun bir nedeni olabilir. Ayrıca lipid profili sigara, diyet, egzersiz ve hiperlipidemi ilaçları gibi etkenlerden etkilenen bir parametredir. Çalışmamızda bu etkenlerin göz önünde bulundurulmaması lipid profili değerlendirmesi açısından eksiklik oluşturmaktadır. Aile öyküsü olan ancak diyabetik olmayan kardeşlerin beklenen şekilde ortalama HOMA-IR seviyeleri 2.52 saptanmıştır. Çalışmamızda insülin rezistansını değerlendirmek amacıyla altın standart olan ancak zaman alıcı, maliyeti yüksek ve uygulaması meşakkatli olan klemp yöntemi yerine daha basit bir yöntem olan HOMA-IR formülü kullanılmıştır. Kendisinde ve ailesinde diyabet öyküsü olmayan grupta HOMA-IR seviyesine bakılarak karşılaştırma yapılmaması çalışmamız açısından bir eksiklik oluşturabilir ancak çalışmanın amacının genetik polimorfizmler ile İD arasındaki ilişkiyi saptamak olduğu için böyle bir yol çizilmiştir.

İD, yağ metabolizması ve VKİ üzerinde PPAR- γ gen Pro12Ala polimorfizminin etkileri başka faktörlerin etkisi altındadır ve karmaşık şekildedir. Yapılan birçok çalışmada PPAR- γ gen Pro12Ala polimorfizmi T2DM ile ilişkili bulunmuştur (146-

148). Buna karşılık Hasstedt S.J. ve arkadaşlarının yaptığı Tip 2 diyabetiklerin yakınlarının katıldığı çalışmada Pro12Ala polimorfizminin diyabet gelişimi üzerine etkisi gösterilememiştir (125). Bendlová B. ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada Çek toplumunda T2DM aile öyküsü olan ve olmayan bireylerde VKİ'ne göre düzeltme yapıldığında glukoz, lipid profili parametreleri ve Pro12Ala polimorfizmi açısından fark bildirilmemiştir (149). Tönjes ve arkadaşlarının yaptığı 57 çalışma sonuçlarının metaanaliz değerlendirmesinde diyabetik olmayan popülasyonda Pro12Ala polimorfizmi ile VKİ, insülin, HOMA-IR, glukoz arasında bir ilişki saptanmamıştır (150). Pro12Ala polimorfizmi görülme sıklığı toplumlara ve ırklara göre değişiklik göstermektedir.

Türk toplumunda Pro12Ala polimorfizmi sıklığı ve etkilerinin incelendiği büyük çaplı bir çalışma bulunmamaktadır. Pro12Ala polimorfizmi, Tok ve arkadaşının (151) yaptığı çalışmada gestasyonel DM'li hastalarda %19.4 ve diyabetik olmayan gebelerde %16 olarak bildirilmiştir. Zengi ve arkadaşları tarafından yapılan Tip 2 diyabetiklerin non-diyabetik birinci derece akrabalarında PPAR- γ gen Pro12Ala polimorfizm sıklığı ile metabolik parametreler ve karotis intima media kalınlığının araştırılması çalışmasında (152) Pro12Ala polimorfizm sıklığı aile öyküsü olmayan diyabetik olmayan grupta %9.9, aile öyküsü olan diyabetik olmayan grupta ise %14.6 tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca Pro12Ala polimorfizmi ile metabolik parametreler arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda metabolik parametreler ile Pro12Ala polimorfizmi arasında ilişki saptanmaması bu çalışmalar ile uyumludur ancak hiçbir grubumuzda Pro12Ala polimorfizmine rastlamadık, bu da çalışma grubunun küçüklüğü nedeni ile oluşmuş olabilir.

Son zamanlarda T2DM etiyopatogenezinde İD'e ek olarak beta hücre salgı (insülin sekresyonu) defektinde önemli genetik ağırlıklı patojenik faktör olduğu düşünülmektedir (48, 79, 153). Genotip skorlaması yapılan 2377 kişi ile yapılan çalışmada rs7903146'yı da içeren 18 SNP'ye bakılmış. Çalışma sonunda rs7903146 polimorfizmi T2DM gelişimi ile ilişkili bulunmuş (18). İsveçli 17,284, Finlandiyalı 2770 kişiyi içeren ortalama takip süresi 23,5 yıl olan çalışma sonucunda T2DM ile aile öyküsü, artmış BKİ, sigara içme, artmış kan basıncı ve trigliserid düzeyleri ilişkili bulunmuş. Çalışmada TCF7L2 ve PPAR- γ 'da içeren 11 gen varyantı incelenmiş. Çalışılan 11 gen T2DM gelişimi ile ilişkili bulunurken, TCF7L2'yi de içeren 8 gen

varyantı azalmış insülin sekresyonu ile ilişkili bulunmuş (93). Çalışmamızdaki tüm gruplarda insülin sekresyonunda etkili olduğu daha önce yapılan çalışmalarda adından sıkça söz ettiren TCF7L2 geninde rs7903146 ve rs12255372 polimorfizm ve genotipleme çalışması yapılmıştır.

TCF7L2 gen polimorfizmi (**rs12255372**) açısından genotiplemesinde 1. grupta GG %42,9, GT %42,9, TT %14,3, 2. grupta GG %37, GT %48,1, TT %14,8, 3. grupta GG %45, GT %50, TT %5 saptanmıştır. TCF7L2 gen polimorfizmi (**rs7903146**) açısından genotiplemesinde 1. grupta CC %32,1, CT %64,3, TT %3,6, 2. grupta CC %37, CT %59,3, TT %3,7, 3. grupta CC %45, CT %55, TT %0 saptandı. Birinci ve ikinci gruplar arasında genotipik yönden anlamlı farklılık saptanmamıştır. Üçüncü grupta TT ve CT/GT genotip taşınma sıklığı diğer 2 gruba göre daha düşük saptanmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmamıştır. Allel dağılımı **rs12255372** açısından incelendiğinde 1. grupta G alleli %64,29, T alleli %35,71, 2. grupta G alleli %61,11, T alleli % 38,29, 3. grupta G alleli %70, T alleli %30 saptanmıştır. Allel dağılımı **rs7903146** açısından incelendiğinde 1. grupta C alleli %64,28, T alleli %35,72, 2. grupta C alleli %66,67, T alleli %33,33, 3. grupta C alleli %72,5, T alleli %27,5 saptanmıştır. 1 ve 2. gruplar arasında allel dağılımı açısından farklılık saptanmazken, 3. grupta diğer 2 gruba göre T allel taşınma oranı daha düşük saptanmış, ancak istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Üçüncü grupta bulunan bulguların istatistiksel açıdan anlamlı çıkmaması çalışma grubunun küçüklüğünden kaynaklanabilir. Kendisinde ve aile öyküsünde diyabet olmayan bireylerde; diyabet öyküsü olan diyabetik ve nondiyabetik bireylere göre T allelinin daha az saptanması Tip 2 diyabet gelişiminde TCF7L2 gen polimorfizminin önemine işaret eder bu da daha önce yapılan başka çalışmalar (129, 130, 138) ile uyumludur. Fakat aile öyküsü olan ancak diyabet olmayan bireylerle diyabetik yakınlarının T allel dağılımının benzer olması diyabet gelişimi açısından TCF7L2 gen polimorfizminin tek başına yeterli olmadığını diğer genetik faktörler ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıktığını gösterebilir.

T2DM gelişimine karşı dirençli olduğunu düşündüğümüz DM aile öyküsü olan diyabetik olmayan kardeşlerde insülin sekresyon değerlendirmesi amacı ile 30. dakika insülinogenik indeks ve HOMA-B cell parametrelerine bakılmıştır. Bu testler OGTT ile yapılmaktadır ve çeşitli faktörlerden etkilenebildiği için kişiden kişiye farklılık

gösterebilir. Glukoza yanıt olarak ilk ve ikinci faz insülin sekresyonunun değerlendirilmesinde en güvenilir yöntem hiperglisemik klemp tekniğidir. Bu testin zahmetli, pahalı ve zor bir işlem olması nedeni ile çalışmamızda HOMA-B cell ve 30. dakika insülinogenik indeks parametreleri kullanılmıştır (153). Çalışmamızda TCF7L2 gen genotipleri ile HOMA- B cell ve 30. dakika insülinogenik indeks arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Genotipleme ile ilişkinin olmaması kullanılan yöntemle ilgili olabilir. Yapılan büyük çaplı çalışmalarda PPAR- γ gen Pro12Ala ve TCF7L2 gen rs7903146 ve rs12255372 polimorfizmleri ile T2DM arasında ilişki bulunmuştur. Bu çalışmada da böyle bir ilişki bulunması beklenmiştir. Bu çalışma ön çalışma olarak tasarlanmıştır ve gelecekteki çalışmalara yön göstermesi açısından küçük gruplarda çalışılmıştır. Ancak çalışmaya genetik benzerliği yüksek olan diyabet yönünden zengin aileler alınmıştır.

Sonuç olarak diyabet yönünden zengin ailelerde diyabetik kişiler ve bunların diyabetik olmayan kardeşleri arasında PPAR- γ gen Pro12Ala ve TCF7L2 gen rs7903146 ve rs12255372 polimorfizmi açısından farklılık saptanmamıştır, bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Tip 2 Diyabetik Hastalar ile Diyabeti Olmayan Kardeşlerinde TCF7L2 VE PPAR- γ Genlerindeki Genetik Polimorfizmin PCR-RFLP Metodu ile Araştırılması

Tip 2 Diabetes mellitus prevalansı dünyada ve ülkemizde giderek artmakta olup etiyopatogenezinde çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi söz konusudur. Peroksisom proliferator tarafından aktive edilen reseptör- γ (PPAR- γ) ve transkripsiyon faktör 7 benzeri 2 (TCF7L2) genlerindeki polimorfizmler Tip 2 diyabetin genetik patogenezinde sıkça suçlanan genetik varyantlardan bazılarıdır.

Bu çalışma Tip 2 diyabet tanısı olup diyabet yönünden ailesi zengin olan (kendisi hariç ≥ 3 diyabetli birinci derece akraba) 16 indeks hasta ile ulaşılabilen Tip 2 diyabetik birinci derece akrabalarından 12 kişi olmak üzere 28 diyabetik hasta (Grup 1), bunların ailede en erken diyabet tanı yaşından 10 yıl geçmesine rağmen Tip 2 diyabet geliştirmemiş 27 kardeşleri (Grup 2) ve kendisi ile birinci dereceden akrabalarında Tip 2 diyabet öyküsü olmayan 20 sağlıklı bireyde (Grup 3) PPAR- γ Pro12Ala ve TCF7L2 gen polimorfizmi (**rs12255372** ve **rs7903146**) araştırıldı. Ayrıca Grup 2'deki bireylerin oral glukoz tolerans testi ile insülin sekresyonu yetenekleri incelendi.

Grup 1 ve 2 arasında vücut kitle indeksi açısından anlamlı farklılık saptanmadı. Çalışmaya katılan hiçbir bireyde PPAR- γ Pro12Ala gen polimorfizmi saptanmadı. Grup 1 ve 2 arasında TCF7L2 gen polimorfizmi genotipleme açısından anlamlı farklılık saptanmadı. Grup 3'te ise TT genotipi ve T alleli taşıma oranı diğer gruplara göre daha az bulunmakla beraber bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi. Grup 2'de insülin salınım değerlendirme için bakılan HOMA B-cell ve insülinogenik indeks (30.dk) ölçümleri ile TCF7L2 polimorfizm genotipleme arasında anlamlı ilişki bulunmadı.

Sonuç olarak PPAR- γ Pro12Ala polimorfizmi Tip 2 diyabet gelişiminde etkisiz bulunmuştur. Ancak TCF7L2 gen polimorfizmi güçlü bir belirleyici olmamakla beraber diğer genetik ve çevresel faktörlerle beraber diyabet gelişiminde rol oynayabilir. Bu modelin daha çok sayıda diyabet yönünden zengin aile üzerinde ve daha fazla sayıda genetik markerlarla tekrarlanması diyabet gelişimini anlamamıza yardımcı olabilir.

Anahtar kelimeler: Tip 2 Diabetes Mellitus, PPAR- γ , TCF7L2, polimorfizm

ABSTRACT

Polymorphisms of TCF7L2 And PPAR- γ in Type 2 Diabetes Mellitus Patients and Their Non-Diabetic Siblings Study With PCR-RFLP Method

Prevalance of type 2 diabetes mellitus is rising in our country and in the world. Environmental and genetic factors interact with each other in the etiopathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Polymorphisms of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) and transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) are thought to be important in the etiopatogenesis of type 2 diabetes.

In this study we evaluated the presence of PPAR- γ Pro12Ala and TCF7L2 polymorfisms (**rs12255372** ve **rs7903146**) in 28 patients with a strong family history of type 2 diabetes (16 index cases with ≥ 3 diabetic first degree relatives and 12 of their first degree relatives) (Group 1), 27 siblings of these patients who did not develop DM despite being 10 years older than the earliest age of diagnosis of DM in the family (Grup 2) and 20 healthy controls with no history of DM in their family (Group 3). Also, patients in group 2 were subjected to oral glucose tolerant test to evaluate their insulin secretion capacity. Body mass index was not significantly different between group 1 and group 2, according to PPAR- γ Pro12Ala gene polimorfism was not detected in any of the participants. There is no significant difference for TCF7L2 gene polimorficism genotyping between group 1 and 2. In group 3, rate of TT genotype and carrying T allele is less than in other groups but this is not statically significant. In group 2, there is no important correlation between HOMA-B cell for insulin secretion evaluation, insulinogenetic index (30 min) measurement and TCF7L2 polymorphism genotyping. In conclusion, PPAR- γ Pro12Ala polimorficism appears to be ineffective in type 2 diabetes development. However TCF7L2 gene polimorficism can have role in development of diabetes along with other genetic and environmental factors though it is not a strong determinant. Repeating this model with a larger number of families with a strong tendency for diabetes and with further genetic markers may help us understand diabetes development better.

Keyword: Type 2 Diabetes Mellitus, PPAR- γ , TCF7L2, polymorphism

KAYNAKLAR

1. Bennett PH, Knowler W.C. In: Joslin E.P. KCR, editor. Joslin's diabetes mellitus. 14th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Willkins; 2005. p. 331.
2. Arısoy E. Diabetes Mellitus. Birinci Basamağa Yönelik Tanı ve Tedavi Rehberi. Ankara: Sağlık Bakanlığı Yayınları; 2003. p. 271-5.
3. Yılmaz M, Bahçece, M. Büyükbese, M.A. Diabetes Mellitus'un Modern Tedavisi. Türkiye Diabet Vakfı Yayınları. İstanbul; 2003. p. 44-9.
4. Genuth S, Eastman R, Kahn R, Klein R, Lachin J, Lebovitz H, et al. Implications of the United kingdom prospective diabetes study. Diabetes Care. 2003 Jan;26 Suppl 1:S28-32.
5. Satman İ. Diabetes Mellitus'un Tanı ve Sınıflaması. Türkiye Klinikleri; 2003. p. 1-2.
6. Yılmaz C, Çetinkalp, S. Değirmenci, C. ve ark. Diabet Tedavisi. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Yayınları. İzmir; 2003. p. 352-7.
7. Levetan C, Mokdad, A.H. Ford, E.S. et all. . Diabetes Prevention: How About Now? Clinical Diabetes. 2001;19:34-8.
8. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 2004 May;27(5):1047-53.
9. Oğuz A, Gedik, O., Hatemi, H. ve ark. , editor. Türkiyede Diabetik Hastalarda Glisemik Kontrolü. National Turkish Diabetes Congress; 2007; İstanbul.
10. Summary of revisions for the 2009 Clinical Practice Recommendations. Diabetes Care. 2009 Jan;32 Suppl 1:S3-5.
11. N. B, editor. Diabetes Mellitus: Tanımı, Tarihçesi, Sınıflaması ve Sıklığı. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fak Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri Diabetes Mellitus Sempozyumu 1997; İstanbul.
12. Mermer S. BA, editor. Damlacık Köyünde Tip II Diabetes Mellitus Prevelansının Belirlenmesi ve Diabetes Mellituslu Hastalara Uygulanan Diabet Eğitimi Programının Değerlendirilmesi. VIII Halk sağlığı Kongresi; 2002; Diyarbakır.
13. Doria A, Patti ME, Kahn CR. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. Cell Metab. 2008 Sep;8(3):186-200.
14. Barroso I, Luan J, Middelberg RP, Harding AH, Franks PW, Jakes RW, et al. Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. PLoS Biol. 2003 Oct;1(1):E20.
15. Kahn CR. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. Diabetes. 1994 Aug;43(8):1066-84.
16. Hamman RF. Genetic and environmental determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). Diabetes Metab Rev. 1992 Dec;8(4):287-338.
17. Hanson RL, Imperatore G, Narayan KM, Roumain J, Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, et al. Family and genetic studies of indices of insulin sensitivity and insulin secretion in Pima Indians. Diabetes Metab Res Rev. 2001 Jul-Aug;17(4):296-303.
18. Meigs JB, Shrader P, Sullivan LM, McAteer JB, Fox CS, Dupuis J, et al. Genotype score in addition to common risk factors for prediction of type 2 diabetes. N Engl J Med. 2008 Nov 20;359(21):2208-19.

19. Lorenzo C, Okoloise M, Williams K, Stern MP, Haffner SM. The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio heart study. *Diabetes Care*. 2003 Nov;26(11):3153-9.
20. Owen KR, McCarthy MI. Genetics of type 2 diabetes. *Curr Opin Genet Dev*. 2007 Jun;17(3):239-44.
21. Mancini FP, Vaccaro O, Sabatino L, Tufano A, Rivellese AA, Riccardi G, et al. Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 is not associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999 Jul;48(7):1466-8.
22. Munoz J, Lok KH, Gower BA, Fernandez JR, Hunter GR, Lara-Castro C, et al. Polymorphism in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with reduced insulin secretion in nondiabetic women. *Diabetes*. 2006 Dec;55(12):3630-4.
23. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, et al. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature*. 1999 Dec 23-30;402(6764):880-3.
24. Joslin EP, Kahn CR. *Joslin's diabetes mellitus*. 14th ed. / edited by C. Ronald Kahn ... [et al.]. ed. Philadelphia, Pa. ; London: Lippincott Williams & Wilkins; 2005: 146-164.
25. Gardner DG, Shoback DM, Greenspan FS. *Greenspan's basic & clinical endocrinology*. 8th ed. ed. New York ; London: McGraw-Hill Medical; 2007: 661-747.
26. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):799-806.
27. James DE, Piper RC. Insulin resistance, diabetes, and the insulin-regulated trafficking of GLUT-4. *J Cell Biol*. 1994 Sep;126(5):1123-6.
28. İmamoğlu Ş. , Ersoy C.Ö. , *Diabetes Mellitus 2009 Multidisipliner Yaklaşım*la Tanı, Tedavi ve İzlem. İstanbul: Deomed Yayıncılık; 2009:7-10.
29. Kahn CR. Knockout mice challenge our concepts of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes. *Exp Diabetes Res*. 2003 Jul-Sep;4(3):169-82.
30. Maiter D, Fliesen T, Underwood LE, Maes M, Gerard G, Davenport ML, et al. Dietary protein restriction decreases insulin-like growth factor I independent of insulin and liver growth hormone binding. *Endocrinology*. 1989 May;124(5):2604-11.
31. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care*. Jan;34 Suppl 1:S11-61.
32. Luzi L, DeFronzo RA. Effect of loss of first-phase insulin secretion on hepatic glucose production and tissue glucose disposal in humans. *Am J Physiol*. 1989 Aug;257(2 Pt 1):E241-6.
33. Porksen N, Nyholm B, Veldhuis JD, Butler PC, Schmitz O. In humans at least 75% of insulin secretion arises from punctuated insulin secretory bursts. *Am J Physiol*. 1997 Nov;273(5 Pt 1):E908-14.
34. Polonsky KS, Sturis J, Van Cauter E. Temporal profiles and clinical significance of pulsatile insulin secretion. *Horm Res*. 1998;49(3-4):178-84.
35. Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest*. 1967 Dec;46(12):1954-62.
36. Brunzell JD, Robertson RP, Lerner RL, Hazzard WR, Ensnick JW, Bierman EL, et al. Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976 Feb;42(2):222-9.

37. Virally M, Blickle JF, Girard J, Halimi S, Simon D, Guillausseau PJ. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes Metab.* 2007 Sep;33(4):231-44.
38. Saad MF, Knowler WC, Pettitt DJ, Nelson RG, Mott DM, Bennett PH. The natural history of impaired glucose tolerance in the Pima Indians. *N Engl J Med.* 1988 Dec 8;319(23):1500-6.
39. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med.* 1993 Dec 30;329(27):1988-92.
40. Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet.* 1992 Oct 17;340(8825):925-9.
41. Leahy JL. Natural history of beta-cell dysfunction in NIDDM. *Diabetes Care.* 1990 Sep;13(9):992-1010.
42. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1999 Sep;104(6):787-94.
43. Mitrakou A, Kelley D, Mokan M, Veneman T, Pangburn T, Reilly J, et al. Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med.* 1992 Jan 2;326(1):22-9.
44. Swinburn BA, Gianchandani R, Saad MF, Lillioja S. In vivo beta-cell function at the transition to early non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 1995 Jun;44(6):757-64.
45. U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes.* 1995 Nov;44(11):1249-58.
46. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet.* 2002 Mar 9;359(9309):824-30.
47. Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB. Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999 Feb;48(2):241-53.
48. İmamoğlu Ş. , Ersoy C.Ö. , Diabetes Mellitus 2009 Multidisipliner Yaklaşımla Tanı, Tedavi ve İzlem. İstanbul: Deomed Yayıncılık; 2009:54-68.
49. Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF, Jr., Jarvholm B. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med.* 2000 Nov 2;343(18):1305-11.
50. Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW, Jr. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 1999 Oct 7;341(15):1097-105.
51. Barrett-Connor EL. Obesity, atherosclerosis, and coronary artery disease. *Ann Intern Med.* 1985 Dec;103(6 (Pt 2)):1010-9.
52. Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med.* 1990 Dec 15;113(12):909-15.
53. Wilding JPH. Obesity and nutritional factors in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Pickup JC, Williams G, eds. *Textbook of diabetes.* Oxford: Blackwell Science, 2003.ch.21p.21.1-21.16.

54. White MF. Insulin receptor signalling and regulation. Pickup JC W, eds. Textbook of diabetes. Oxford: Blackwell Science;2003 ch 14p.14.1-14.17.
55. Banerji MA, Lebowitz J, Chaiken RL, Gordon D, Kral JG, Lebovitz HE. Relationship of visceral adipose tissue and glucose disposal is independent of sex in black NIDDM subjects. *Am J Physiol.* 1997 Aug;273(2 Pt 1):E425-32.
56. Campbell PJ, Carlson MG, Nurjhan N. Fat metabolism in human obesity. *Am J Physiol.* 1994 Apr;266(4 Pt 1):E600-5.
57. Jensen MD, Haymond MW, Rizza RA, Cryer PE, Miles JM. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest.* 1989 Apr;83(4):1168-73.
58. Yoshioka N, Kuzuya T, Matsuda A, Taniguchi M, Iwamoto Y. Serum proinsulin levels at fasting and after oral glucose load in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1988 Jun;31(6):355-60.
59. Goldstein BJ, Ahmad F, Ding W, Li PM, Zhang WR. Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem.* 1998 May;182(1-2):91-9.
60. Pajvani UB, Scherer PE. Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr Diab Rep.* 2003 Jun;3(3):207-13.
61. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet.* 2003 Jan 18;361(9353):226-8.
62. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002 Nov;8(11):1288-95.
63. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med.* 2001 Aug;7(8):941-6.
64. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993 Jan 1;259(5091):87-91.
65. Samad F, Yamamoto K, Pandey M, Loskutoff DJ. Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. *Mol Med.* 1997 Jan;3(1):37-48.
66. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA.* 1999 Dec 8;282(22):2131-5.
67. Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, et al. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2002 May;109(10):1321-6.
68. Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfeld C, et al. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology.* 1995 May;136(5):2143-9.
69. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes.* 2002 Dec;51(12):3391-9.
70. Gottlieb MS. Diabetes in offspring and siblings of juvenile- and maturity-onset diabetics. *J Chronic Dis.* 1980;33(6):331-9.

71. Newman B, Selby JV, King MC, Slemenda C, Fabsitz R, Friedman GD. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia*. 1987 Oct;30(10):763-8.
72. Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH. Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. *Diabetes Metab Rev*. 1990 Feb;6(1):1-27.
73. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005 Apr 9-15;365(9467):1333-46.
74. Pierce M, Keen H, Bradley C. Risk of diabetes in offspring of parents with non-insulin-dependent diabetes. *Diabet Med*. 1995 Jan;12(1):6-13.
75. Tattersall RB, Fajans SS. Prevalence of diabetes and glucose intolerance in 199 offspring of thirty-seven conjugal diabetic parents. *Diabetes*. 1975 May;24(5):452-62.
76. Kawate R, Yamakido M, Nishimoto Y, Bennett PH, Hamman RF, Knowler WC. Diabetes mellitus and its vascular complications in Japanese migrants on the Island of Hawaii. *Diabetes Care*. 1979 Mar-Apr;2(2):161-70.
77. Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia*. 1999 Feb;42(2):139-45.
78. Malecki MT. Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005 Jun;68 Suppl1:S10-21.
79. Gloyn AL, McCarthy MI. The genetics of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2001 Sep;15(3):293-308.
80. Joslin EP, Kahn CR. *Joslin's diabetes mellitus*. 14th ed. / edited by C. Ronald Kahn ... [et al.]. ed. Philadelphia, Pa. ; London: Lippincott Williams & Wilkins; 2005: 377-385.
81. Fujimoto WY, Bergstrom RW, Boyko EJ, Kinyoun JL, Leonetti DL, Newell-Morris LL, et al. Diabetes and diabetes risk factors in second- and third-generation Japanese Americans in Seattle, Washington. *Diabetes Res Clin Pract*. 1994 Oct;24 Suppl:S43-52.
82. Grant RW, Moore AF, Florez JC. Genetic architecture of type 2 diabetes: recent progress and clinical implications. *Diabetes Care*. 2009 Jun;32(6):1107-14.
83. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979 Sep;237(3):E214-23.
84. Caro JF. Clinical review 26: Insulin resistance in obese and nonobese man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Oct;73(4):691-5.
85. Bergman RN, Finegood DT, Ader M. Assessment of insulin sensitivity in vivo. *Endocr Rev*. 1985 Winter;6(1):45-86.
86. Shoji T, Emoto M, Nishizawa Y. HOMA index to assess insulin resistance in renal failure patients. *Nephron*. 2001 Nov;89(3):348-9.
87. Kang ES, Yun YS, Park SW, Kim HJ, Ahn CW, Song YD, et al. Limitation of the validity of the homeostasis model assessment as an index of insulin resistance in Korea. *Metabolism*. 2005 Feb;54(2):206-11.
88. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 2004 Jun;27(6):1487-95.
89. Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Nakai Y, Taniguchi A, Matsuura T, et al. Insulin secretion and insulin sensitivity at different stages of glucose tolerance: a cross-sectional study of Japanese type 2 diabetes. *Metabolism*. 2004 Jul;53(7):831-5.

90. Seltzer HS, Allen EW, Herron AL, Jr., Brennan MT. Insulin secretion in response to glycemic stimulus: relation of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1967 Mar;46(3):323-35.
91. Seino Y, Kurahachi H, Goto Y, Taminato T, Ikeda M, Imura H. Comparative insulinogenic effects of glucose, arginine and glucagon in patients with diabetes mellitus, endocrine disorders and liver disease. *Acta Diabetol Lat.* 1975 Mar-Apr;12(2):89-99.
92. Kuroe A, Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Nakai Y, Taniguchi A, et al. Impaired beta-cell function and insulin sensitivity in Japanese subjects with normal glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract.* 2003 Jan;59(1):71-7.
93. Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, et al. Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008 Nov 20;359(21):2220-32.
94. Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res.* 2001;56:239-63.
95. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990 Oct 18;347(6294):645-50.
96. Kiec-Wilk B, Dembinska-Kiec A, Olszanecka A, Bodzioch M, Kawecka-Jaszcz K. The selected pathophysiological aspects of PPARs activation. *J Physiol Pharmacol.* 2005 Jun;56(2):149-62.
97. Leff T, Mathews ST, Camp HS. Review: peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and its role in the development and treatment of diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2004 Apr-Jun;5(2):99-109.
98. Gurnell M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the regulation of adipocyte function: lessons from human genetic studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005 Dec;19(4):501-23.
99. Kuenzli S, Saurat JH. Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology. *Br J Dermatol.* 2003 Aug;149(2):229-36.
100. Ferre P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes.* 2004 Feb;53 Suppl 1:S43-50.
101. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res.* 2006 Mar;45(2):120-59.
102. Walczak R, Tontonoz P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism. *J Lipid Res.* 2002 Feb;43(2):177-86.
103. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994 May 15;8(10):1224-34.
104. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell.* 1999 Oct;4(4):585-95.
105. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell.* 1999 Oct;4(4):597-609.
106. Adams M, Montague CT, Prins JB, Holder JC, Smith SA, Sanders L, et al. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific

- effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest.* 1997 Dec 15;100(12):3149-53.
107. Guan Y. Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Nov;15(11):2801-15.
108. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):581-9.
109. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994 Dec 30;79(7):1147-56.
110. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, et al. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest.* 2000 Nov;106(10):1221-8.
111. Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, Devchand P, Francis S, Kadakia M, et al. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med.* 2007 Aug;262(2):184-98.
112. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000 Aug;106(4):523-31.
113. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):18779-89.
114. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet.* 1998 Nov;20(3):284-7.
115. Ristow M, Muller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med.* 1998 Oct 1;339(14):953-9.
116. Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, et al. Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes.* 1998 Nov;47(11):1806-8.
117. Hara K, Okada T, Tobe K, Yasuda K, Mori Y, Kadowaki H, et al. The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Apr 29;271(1):212-6.
118. Hamann A, Munzberg H, Buttron P, Busing B, Hinney A, Mayer H, et al. Missense variants in the human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene in lean and obese subjects. *Eur J Endocrinol.* 1999 Jul;141(1):90-2.
119. Douglas JA, Erdos MR, Watanabe RM, Braun A, Johnston CL, Oeth P, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12A1a variant: association with type 2 diabetes and trait differences. *Diabetes.* 2001 Apr;50(4):886-90.
120. Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, et al. The Pro12-->Ala substitution in PPAR-gamma is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2001 Apr;50(4):891-4.

121. Masud S, Ye S. Effect of the peroxisome proliferator activated receptor-gamma gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. *J Med Genet.* 2003 Oct;40(10):773-80.
122. Ostergard T, Ek J, Hamid Y, Saltin B, Pedersen OB, Hansen T, et al. Influence of the PPAR-gamma2 Pro12Ala and ACE I/D polymorphisms on insulin sensitivity and training effects in healthy offspring of type 2 diabetic subjects. *Horm Metab Res.* 2005 Feb;37(2):99-105.
123. Jacob S, Stumvoll M, Becker R, Koch M, Nielsen M, Loblein K, et al. The PPARgamma2 polymorphism pro12Ala is associated with better insulin sensitivity in the offspring of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res.* 2000 Oct;32(10):413-6.
124. Koch M, Rett K, Maerker E, Volk A, Haist K, Deninger M, et al. The PPARgamma2 amino acid polymorphism Pro 12 Ala is prevalent in offspring of Type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. *Diabetologia.* 1999 Jun;42(6):758-62.
125. Hasstedt SJ, Ren QF, Teng K, Elbein SC. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 pro(12)ala variant on obesity, glucose homeostasis, and blood pressure in members of familial type 2 diabetic kindreds. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Feb;86(2):536-41.
126. Damcott CM, Pollin TI, Reinhart LJ, Ott SH, Shen H, Silver KD, et al. Polymorphisms in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene are associated with type 2 diabetes in the Amish: replication and evidence for a role in both insulin secretion and insulin resistance. *Diabetes.* 2006 Sep;55(9):2654-9.
127. Nielsen EM, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T, Glumer C, et al. The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003 Feb;52(2):573-7.
128. Lyssenko V, Almgren P, Anevski D, Orho-Melander M, Sjogren M, Saloranta C, et al. Genetic prediction of future type 2 diabetes. *PLoS Med.* 2005 Nov 1;2(12):e345.
129. Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PI, Shuldiner AR, et al. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med.* 2006 Jul 20;355(3):241-50.
130. Hu C, Zhang R, Wang C, Wang J, Ma X, Hou X, et al. Variants from GIPR, TCF7L2, DGKB, MADD, CRY2, GLIS3, PROX1, SLC30A8 and IGF1 are associated with glucose metabolism in the Chinese. *PLoS One.* 5(11):e15542.
131. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2006 Mar;38(3):320-3.
132. Zeggini E, McCarthy MI. TCF7L2: the biggest story in diabetes genetics since HLA? *Diabetologia.* 2007 Jan;50(1):1-4.
133. Zhang C, Qi L, Hunter DJ, Meigs JB, Manson JE, van Dam RM, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and the risk of type 2 diabetes in large cohorts of U.S. women and men. *Diabetes.* 2006 Sep;55(9):2645-8.
134. Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene.* 1999 Dec 20;18(55):7860-72.
135. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jun 5;1653(1):1-24.

136. Yi F, Brubaker PL, Jin T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem*. 2005 Jan 14;280(2):1457-64.
137. Deacon CF. Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. *Diabetes*. 2004 Sep;53(9):2181-9.
138. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2007 Aug;117(8):2155-63.
139. Field SF, Howson JM, Smyth DJ, Walker NM, Dunger DB, Todd JA. Analysis of the type 2 diabetes gene, TCF7L2, in 13,795 type 1 diabetes cases and control subjects. *Diabetologia*. 2007 Jan;50(1):212-3.
140. Cauchi S, Meyre D, Dina C, Choquet H, Samson C, Gallina S, et al. Transcription factor TCF7L2 genetic study in the French population: expression in human beta-cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006 Oct;55(10):2903-8.
141. Burwinkel B, Shanmugam KS, Hemminki K, Meindl A, Schmutzler RK, Sutter C, et al. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variant is associated with familial breast cancer risk: a case-control study. *BMC Cancer*. 2006;6:268.
142. Daniel M, Marion SA, Sheps SB, Hertzman C, Gamble D. Variation by body mass index and age in waist-to-hip ratio associations with glycemic status in an aboriginal population at risk for type 2 diabetes in British Columbia, Canada. *Am J Clin Nutr*. 1999 Mar;69(3):455-60.
143. Strojek K, Grzeszczak W, Morawin E, Adamski M, Lacka B, Ritz E. Reduced insulin-mediated glucose uptake by euglycemic clamp in offspring of patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1998;106(6):470-4.
144. Strackowski M, Kowalska I, Stepień A, Dzienis-Strackowska S, Szelachowska M, Kinalska I, et al. Insulin resistance in the first-degree relatives of persons with type 2 diabetes. *Med Sci Monit*. 2003 May;9(5):CR186-90.
145. Srinivasan SR, Frontini MG, Berenson GS. Longitudinal changes in risk variables of insulin resistance syndrome from childhood to young adulthood in offspring of parents with type 2 diabetes: the Bogalusa Heart Study. *Metabolism*. 2003 Apr;52(4):443-50; discussion 51-3.
146. Ringel J, Engeli S, Distler A, Sharma AM. Pro12Ala missense mutation of the peroxisome proliferator activated receptor gamma and diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jan 19;254(2):450-3.
147. Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med*. 1994 Nov 3;331(18):1188-93.
148. Stumvoll M, Haring H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes*. 2002 Aug;51(8):2341-7.
149. Bendlova B, Vejrazkova D, Vcelak J, Lukasova P, Burkonova D, Kunesova M, et al. PPARgamma2 Pro12Ala polymorphism in relation to free fatty acids concentration and composition in lean healthy Czech individuals with and without family history of diabetes type 2. *Physiol Res*. 2008;57 Suppl 1:S77-90.
150. Tonjes A, Scholz M, Loeffler M, Stumvoll M. Association of Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma with Pre-diabetic phenotypes: meta-analysis of 57 studies on nondiabetic individuals. *Diabetes Care*. 2006 Nov;29(11):2489-97.

151. Tok EC, Ertunc D, Bilgin O, Erdal EM, Kaplanoglu M, Dilek S. PPAR-gamma2 Pro12Ala polymorphism is associated with weight gain in women with gestational diabetes mellitus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006 Nov;129(1):25-30.
152. Zengi A, Saygılı, F. Tip 2 diyabetiklerin non-diyabetik birinci derece akrabalarında PPAR- γ gen Pro12Ala polimorfizm sıklığı ile metabolik parametreler ve karotis intima media kalınlığının araştırılması [Tez Çalışması]. Aralık 2009.
153. Stumvoll M, Fritsche A, Haring H. The OGTT as test for beta cell function? *Eur J Clin Invest.* 2001 May;31(5):380-1.