

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ABD.
ENDOKRİNOLOJİ ve METABOLİZMA HASTALIKLARI BD.

**TİP 2 DİYABETİKLERİN NON-DİYABETİK BİRİNCİ DERECE
AKRABALARINDA PPAR- γ 2 GEN Pro12A1a POLİMORFİZM
SIKLIĞI İLE METABOLİK PARAMETRELER VE KAROTİS
İNTİMA MEDIA KALINLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Uzm. Dr. Ayhan ZENGİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. L. Füsün SAYGILI

İZMİR
Aralık-2009

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasındaki katkılarından dolayı tez danışmanım ve Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları BD Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. L. Füsün Saygılı'ya, İç Hastalıkları ihtisasım sırasında bana Endokrinoloji bilim dalını sevdiren, Endokrinoloji eğitimime başlamama vesile olan ve eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini paylaşarak yetişmemde emeği geçen diğer değerli hocalarım Prof. Dr. Taylan Kabalak, Ege Üniversitesi Rektörü Prof. Dr. Candeğer Yılmaz, Prof. Dr. Mehmet Tüzün, Prof. Dr. A. Gökhan Özgen, Yrd. Doç. Dr. Şevki Çetinkalp ile güzel bir çalışma ortamı sağlayarak bizleri destekleyen İç Hastalıkları ABD Başkanı Prof. Dr. Fehmi Akçiçek'e, tezimin hazırlığında çeşitli aşamalardaki katkılarından dolayı Doç Dr. Sadık Tamsel, Uzm. Dr. Nur Selvi, Araştırma Görevlisi Burçin Tezcanlı, Prof. Dr. Gülinnaz Ercan, Prof. Dr. Osman Çağlayan, Uzm. Dr. Ilgın Yıldırım Şimşir, hemşire Çiğdem Kahraman ve Endokrinoloji Laboratuvarı' nın değerli çalışanlarına, ihtisasım boyunca pek çok paylaşımda bulunduğum kıymetli çalışma arkadaşlarım ile İç hastalıkları ve Endokrinoloji Ailesi' nin tüm üyerine teşekkürü bir borç bilirim.

**TİP 2 DİYABETİKLERİN NONDİYABETİK BİRİNCİ DERECE
AKRABALARINDA PPAR γ GEN Pro12Ala POLİMORFİZM SIKLIĞI İLE
METABOLİK PARAMETRELER VE KAROTİS İNTİMA MEDIA KALINLIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Tip 2 Diabetes Mellitus(T2DM) patogeneğinde bozulmuş insülin sekresyonu ve insülin direnci(İD) olmak üzere 2 temel bozukluk yer almaktadır. Hastalığın klinik tablosu, genetik ve çevresel faktörlerin karşılıklı etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bazı monogenik formların dışında, T2DM sıklıkla poligenik bir hastalıktır. Yaygın olarak görülen T2DM formu ile ilişkili olduğu kanıtlanmış genetik varyantlardan biri peroksizom proliferator tarafından aktive edilen reseptör- γ 2 (PPAR- γ 2) gen Pro12Ala polimorfizmidir. Bu çalışmada tip 2 diyabetiklerin non-diyabetik birinci derece akrabalarında PPAR- γ 2 gen Pro12Ala polimorfizm sıklığı ile bu polimorfizmin antropometrik, metabolik ve diğer parametrelere olası etkilerinin araştırılması planlandı. T2DM aile öyküsü(AÖ) bulunan 104 (77 kadın, 27 erkek) ve AÖ bulunmayan 91 (48 kadın, 43 erkek), non-diyabetik, normotansif, non-obez kişi PPAR- γ 2 Pro12Ala polimorfizmi, metabolik parametreler ve karotis intima media kalınlığı(İMK) açısından kıyaslandı. İki grubun Pro12Ala polimorfizm sıklığı benzerdi($p>0.05$). Sistolik ve diyastolik kan basıncı, total ve LDL-kolesterol düzeyleri, HOMA-IR değeri, sağ ve sol karotis İMK her iki grupta benzerdi ($p>0.05$). BKİ, bel çevresi, HDL-kolesterol, fibrinojen, açlık glukozu, AUC-glukoz, AUC-insülin, cinsiyet ilişkisinin, trigliserid ve adiponektin düzeyleri hem cinsiyet hem de sigara ilişkisinin gözlendiği parametrelerdi. AÖ ile BKİ arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı($p=0.020$). Açlık glukoz ve AUC-glukoz açısından erkeklerde her iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanırken kadınlar arasında bu farklılık gözlenmedi. Her iki grupta ve her iki cinste, sigara içenlerde, içmeyenler ile kıyaslandığında trigliserid düzeyleri daha yüksek, adiponektin düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşüktü (sırası ile $p<0.05$, $p=0.002$). Kadınlarda hs-CRP düzeyleri AÖ ile ilişkili bulundu($p<0.05$). Erkeklerde ise AÖ

olanlarda hs-CRP düzeyleri olmayanlara göre daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Pro12Ala ile metabolik parametreler arasında ilişki saptanmadı. Sonuç olarak, Türk Toplumunda tip 2 diyabetiklerin non-diyabetik, non-obez, birinci derece aile bireylerinde, PPAR- γ 2 gen Pro12Ala polimorfizm sıklığı aile öyküsü olmayanlardan farklı bulunmamıştır. Antropometrik, metabolik, inflamatuvar ve diğer parametreler üzerine polimorfizm etkisi saptanmamış olmakla birlikte cinsiyet ve aile öyküsü kaynaklı farklılıklar gözlenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Glukoz Homeostazı	3
2.2. T2DM Patofizyolojisi	4
2.3. T2DM Genetiği	7
2.4. Diabetes Mellitus Tanısı	8
2.5. İD' nin Düzeyinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	9
2.6.1. PPAR Ailesi	10
2.6.2. PPAR- γ Yapısal Özellikleri ve Biyolojik Etkileri	11
2.6.2.a. PPAR- γ ve Adipogenenez	14
2.6.2.b. PPAR- γ ' nın İnsülin Duyarlılığına Etkileri	15
2.6.2.c. PPAR- γ ' nın Vasküler Etkileri	17
2.6.3. PPAR- γ 2 Gen Polimorfizmi ve Etkileri.....	18
3. YÖNTEM ve GEREÇLER	22
3.1. Hasta ve Kontrol Grubununun Seçimi.....	22
3.2. Antropometrik Ölçümler	22
3.3. Laboratuvar Tetkikleri	23
3.4. Genotip analizi- PPAR- γ gen ekzon 2, kodon 12 analizi	23
3.4.1. Kandan DNA İzolasyonu Aşaması	23
3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	25
3.4.3. PPAR Pro12Ala Polimorfizminin Belirlenmesi için Gerçekleştirilen Genotip Analizi	26
3.4.4. PCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanması	27
3.4.5. % 2' lik Agaroz Jel Hazırlama.....	27

3.4.6. PPAR Pro12Ala Polimorfizm Analizi için Restriksiyon	
Enzim Kesimi	28
3.5. Karotis İntima Media Kalınlığı Ölçümü.....	30
3.6. Kullanılan İstatistik Yöntem.....	30
4. SONUÇLAR.....	31
5. TARTIŞMA.....	36
KAYNAKLAR	45

KISALTMALAR

ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
AMPK	: AMP-tarafından aktive olan protein kinaz
AÖ	: Aile öyküsü
APG	: Açlık plazma glukozu
AUC	: (Area under the curve- eğri altı alan)
bç	: Baz çifti
BKİ	: Beden kitle indeksi
CRP	: C-reaktif protein
FABP	: Yağ asidi bağlayan protein
FATP	: Yağ asidi transport protein
GLUT	: Glukoz transporter
HOMA-IR	: Homeostasis model assessment of insulin resistance
IL-6	: İnterlökin-6
IRS	: İnsülin-reseptör substrat
İD	: İnsülin direnci
İMK	: İntima media kalınlığı(IMK)
İR	: İnsülin reseptörü
MODY	: Maturity onset diabetes of the young
NO	: Nitrik oksit
OGTT	: Oral glukoz tolerans test
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitör-1
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI3-kinaz	: Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PPAR-γ2	: Peroksizom proliferator tarafından aktive edilen reseptör- γ2
PPRE	: Peroxisome proliferator response element
RXR	: Retinoid X reseptör
T2DM	: Tip 2 Diabetes Mellitus
TG	: Trigliserid
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör-α
TZD	: Tiazolidinedion
UKPDS	: United Kingdom Prospective Diabetes Study
11 β-HSD I	: 11β-hidroksisteroid dehidrogenaz tip I

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Diabetes mellitus, glukoz düzeylerinin uzun süreli yüksekliği ile karakterize bir grup metabolik hastalık şeklinde tanımlanmaktadır(1). Kronik hiperglisemi uzun dönemde çeşitli doku ve organlarda özellikle de göz, böbrek, sinir, kalp ve damarlarda hasar, fonksiyon bozukluğu ve yetmezlik ile ilişkilidir. Henüz tanı almamış veya hastalığı kontrol altına alınmamış diyabetiklerde körlük, renal yetmezlik, felç ve ekstremitte amputasyonları morbidite ve mortaliteyi artırmaktadır. Tüm ölüm sebepleri arasında beşinci sırada (2) yer almasının yanı sıra, hastalığın kendisi ve komplikasyonlarına yönelik yapılan tedavi harcamaları da topluma büyük bir ekonomik yük getirmektedir(3,4). Diyabetin prevalansı tüm dünyada giderek artmaktadır. 2000' li yıllarda tahmini 171 milyon olan diyabetli kişi sayısının 2030 ' larda 366 milyona ulaşacağı bildirilmektedir (5). Türk toplumunda ise nüfusun %7.2' si diyabetiktir(6). Diabetes Mellitus, bu sebeplerden dolayı, önemli bir halk sağlığı sorunudur. Toplumda diyabet riski taşıyan kişilerin belirlenmesi için uygun yöntemlerin bulunması, diyabetin henüz ortaya çıkmadan önlenmesini veya erken dönemlerde tedavisini mümkün kılacaktır.

Diyabetin iki önemli formundan biri olan tip 2 Diabetes Mellitus(T2DM), hastalık prevalansının yaklaşık %90-95'ini oluşturmaktadır(1). T2DM patogenezinde 2 temel bozukluk bulunmaktadır; kas, yağ ve karaciğer dokusunda insülin etkisine karşı duyarlılığın azalması ile karakterize insülin direnci(İD) ve pankreas β hücresinden bozulmuş insülin sekresyonu(7). T2DM gelişiminde insülin direnci ve β hücre disfonksiyonunun hangisinin daha önce ve daha önemli olduğu tam bir kesinlik kazanmamıştır(8). T2DM gelişimi açısından risk taşıyan diyabetiklerin birinci derece akrabalarında henüz glukoz tolerans bozukluğu gelişmeden önceki dönemlerde insülin direnci varlığının gösterilmesi hastalığın patogenezinde insülin direncinin primer bozukluk olabileceğini düşündürmüştür(9). Bununla birlikte, diyabet açısından aile öyküsü olmayan non-diyabetik bireylerde sadece İD' nin bulunmasının ileride diyabet gelişimi için çok kuvvetli bir belirleyici olmadığı gösterilmiştir(10). Daha yaygın

kabul edilmekte olan görüş ise her iki bozukluğun da T2DM patogenezinde önemli olduğu ve erken basamaklarında yer aldığıdır(11). Fakat bu iki bozukluğun patogeneze olan etkileri heterojendir, etnik ve kişisel farklılıklar göstermektedir. T2DM çevresel ve genetik faktörlerin karmaşık etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Diyabet açısından pozitif aile öyküsü(AÖ)' ne, azalmış fiziksel aktivite ve dismetabolik durumun (abdominal obezite, insülin direnci, hipertansiyon ve dislipidemi) eklenmesi diyabet gelişim riskini oldukça artırmaktadır(12,13).

Genetik olarak programlanmış insülin direnci ve β hücre fonksiyon bozukluğuna çevresel faktörlerin eklenmesiyle yıllar içinde diyabete ilerleme olmaktadır. Bazı monogenik formların dışında, T2DM sıklıkla poligenik bir hastalıktır. Glukoz transportu, β hücre fonksiyonu, insülin sekresyon ve etki mekanizmasında görevli proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen değişimler (mutasyon ve polimorfizmler) diyabet genetiğinin temelini oluşturmaktadır. Peroksizom proliferator tarafından aktive edilen reseptör- γ 2(PPAR- γ 2) gen, kodon 12' de meydana gelen prolinden alanin aminoasidine değişim (pro12ala polimorfizmi) yaygın olarak görülen T2DM formu ile ilişkili olduğu kanıtlanmış genetik varyantlardan biridir. Bir genetik polimorfizmi veya mutasyonu diagnostik, koruyucu ve terapötik alanda kullanabilmek için hastalığın fenotipe olan etkilerinin ve bu etkinin mekanizmalarının bilinmesi gerekmektedir.

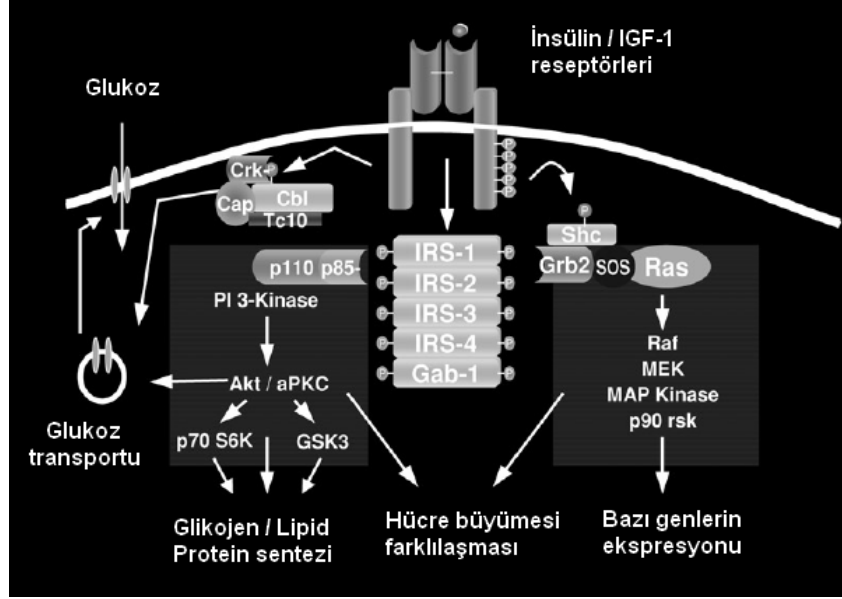
Bu çalışmada, henüz diyabetik olmayan fakat T2DM AÖ' ne sahip riskli kişilerde PPAR γ 2 gen Pro12Ala polimorfizm sıklığı ile bu polimorfizmin antropometrik, metabolik ve diğer parametrelere olası etkilerinin araştırılması planlandı. Elde edilecek sonuçların Pro12Ala polimorfizminin Türk Toplumunda T2DM riskine ne ölçüde etkisinin olduğunu göstermeye yönelik planlanacak olan çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glukoz Homeostazi

Normal bir kişide açlık ve tokluk fark etmeksizin plazma glukoz düzeyi oldukça dar sınırlar içinde tutulur. Bu sıkı kontrol, karaciğer glukoz üretimi ile periferik dokularda glukozun kullanımı arasındaki denge ile sağlanır. İnsülin, kan glukoz düzeyinin temel düzenleyicisidir. Kas ve yağ dokusuna glukoz alımını artırır ve karaciğerde glukoz yapımını inhibe eder. Ayrıca hücre büyümesi ve farklılaşmasını uyarır, lipoliz, glukojenoliz ve protein yıkımını engeller. İnsülin direnci veya eksikliğinde bu süreçlerde bozukluk, açlık ve tokluk kan glukoz ve lipid düzeylerinde yükselme meydana gelir (14).

İnsülin etkisini gösterebilmek için hücre yüzeyinde yer alan kendine özgü reseptörlere bağlanır(Şekil 1). İnsülin reseptörü(İR), tirozin kinaz reseptör ailesindedir. İki α ve tirozin kinaz aktivitesi gösteren iki β zincirinden oluşmuş tetramerik bir yapıdadır. İnsülinin, reseptörüne bağlanmasından sonra β subunitin tirozin kinaz aktivitesi uyarılır ve hücre içi sinyal iletimi başlar. İnsülin sinyal iletiminde iki yolak söz konusudur. Birinci, İnsülin-reseptör substrat(IRS)-1 ve IRS-2 üzerinden gerçekleşir ve fosfatidilinozitol 3-kinaz(PI3-kinaz) enziminin aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu yolak insülinin metabolik etkilerinin gerçekleştirilmesinde önemlidir. Diğer yolak ise Grb2/Sos ve ras üzerinden ilerlerler ve MAP kinazın aktivasyonuna neden olur. Bu yolağın insülinin hücre büyüme ve farklılaşmasını uyarmasında önemli rolü vardır(15).



Şekil 1. İnsülinin moleküler etki mekanizmasının şematik görünümü (Kaynak 15'den değiştirilerek alınmıştır)

2.2. T2DM Patofizyolojisi

T2DM' un çok azı (<%5) monogenik iken çoğu poligeniktir ve kronik hiperglisemi ve dislipidemiye yanıtta metabolik bir düzensizlik söz konusudur. Transgenik hayvan çalışmalarıyla bu bozuklukların nasıl geliştiği ortaya konulmaya çalışılmıştır. Hepatik glukoneogenetik enzimlerin artışı, pankreatik β -hücrelerinde glukokinaz azalması, iskelet kasında tirozin kinaz eksikliği olan insülin reseptörlerinin aşırı sunumu, iskelet kası ve yağ dokusunda GLUT4 glukoz transporterlerinin eksikliği ile glukoz intoleransı gelişmiş, fakat aşikar diyabet ortaya çıkmamıştır(16). Sonuç olarak; T2DM, İD ve insülin sekresyon bozukluğunun ikisinin birlikteliğinde ortaya çıkmaktadır.

β -hücre disfonksiyonu, insülin sekresyonunun pulsatile ve kinetiklerindeki bozukluk, insülindeki kantitatif veya kalitatif anormallikleri ve β -hücre kaybını içerir.

Normoglisemik kişilerde insülin sekresyonu her 10-15 dakikada bir pik ve her 60-120 dakikada daha büyük bir salınım gösterir. Tip 2 diyabetiklerde erken faz insülin sekresyonu kaybolmuş, geç faz ise azalmış ve gecikmiştir. İnsülin

sekresyonunun ilk fazındaki azalma diyabetin erken dönemlerinde hatta prediyabetik dönemde gösterilmiştir. Pulsatile ve glukoz ilk faz insülin yanıtındaki bozulmanın kısmen glukokinaz ve iyon kanallarında fonksiyon bozukluğu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (16).

T2DM' da insülin sekresyonundaki azalma ilerleyicidir. United Kingdom Prospective Diabetes Study(UKPDS) verilerine göre T2DM tanısı alan hastaların çoğunda tanı sırasında β -hücrelerinin sadece %50 sinin fonksiyon gördüğü bilinmektedir. Yaşam tarzı değişikliği, biguanid, sülfonilüre ya da insülin ile tedavi edilenlerin tedaviden 6 yıl sonra fonksiyon gören β -hücresi %25 ' dir. Tip 2 DM tanısından yaklaşık 10-15 yıl sonra endojen insülin sekresyonu normalin %10' u kadardır(17).

Diyabetik olmayanlarda, β -hücrelerinden insülin duyarlılığına göre gereksinim kadar insülin sekrete edilir ve böylece plazma glukoz düzeyinin normal sınırlar içinde sürdürülmesi sağlanır. İnsülin sekresyonu ve duyarlılığı arasında hiperbolik bir ilişki vardır. Kompanzasyon bozulursa plazma glukozu dereceli olarak yükselir. β -hücre fonksiyon bozukluğu diyabetin erken dönemlerinin yanı sıra tip 2 diyabetiklerin normoglisemik birinci derece yakınlarında da gösterilmiştir(18). İD ve insülin sekresyon bozukluğunun ikisinin varlığında T2DM ortaya çıkmaktadır. İD, glukozun karaciğerde aşırı glukoz üretimi ve iskelet kasında azalmış alım ve tüketimi ile karakterizedir.

Çeşitli metodların özellikle de öglisemik hiperinsülinemik klemp tekniğinin kullanılması tip 2 diyabetiklerde İD' nin tanımlanmasında önemli bulgular sağlamıştır. Tip 2 diyabetiklerin yaklaşık %80' i obezdir. Normal kilolu non-diyabetikler ile kıyaslandığında normal kilolu diyabetiklerde İD mevcuttur. Benzer şekilde tip 2 diyabetik obezler kendileri ile benzer derecede obez fakat nondiyabetik kişilere göre daha fazla insülin rezistandırlar. İD' de hem karaciğer hem de perifer dokuların rolü vardır; glukozun karaciğerde aşırı üretimi ve iskelet kasında azalmış alım ve tüketimi söz konusudur. İskelet kasındaki İD'nin, insülin bağımlı glukoz transportundaki bozukluk nedeniyle geliştiği gösterilmiştir.

Tip 2 diyabetiklerde, insülin tarafından uyarılan glukoz transporterlerinin (GLUT4) hücre membranına taşınması azalmıştır(16).

İnsülin bağımlı glukoz kullanımının çok azı yağ dokusunda, %75' den fazlasının ise iskelet kasında gerçekleşmesine rağmen (19), insülin reseptörleri ortadan kaldırılmış fare çalışmalarında yağ dokusunun insülin direnci gelişiminde daha önemli olduğu vurgulanmıştır (14).

ID mekanizmalarından birisi; serbest yağ asidlerinin yağ dokusundan aşırı salınımı sonucu ortaya çıkan lipid metabolitlerinin(açıl-KoA, diaçilgliserol) karaciğer ve iskelet kasında hücre içi birikimi ile meydana getirdiği insülin sinyal iletiminde azalmadır(15). Tip 2 dyabetiklerde kontroller ile kıyaslandığında adipoz dokuda lipolizin uyarılmasında insüline duyarlılık azalmıştır ve özellikle obez diyabetiklerde adipoz dokudan büyük miktarlarda serbest yağ asidi salınımı olmaktadır. Açıl-KoA ve diaçilgliserol birikimi ile protein kinaz C'nin uyarılması IRS' nin serin rezidüleriyle fosforilasyonuna ve insülin sinyal iletiminin azalmasına neden olur.

Diğer mekanizma yağ dokusundan adipokinlerin salınımıdır. Yağ dokusu, lipidler için depo görevini üstlenmesinin yanında insülin direncinde rolleri olduğu düşünülen, adipokinler adı verilen adiponektin, rezistin, leptin ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi çeşitli molekülleri de sekrete eder (14). Yağ hücresinden salınan bu maddeler insülin sentez ve sekresyonunu, β -hücre yaşam süresi ve apoptozunu direkt olarak etkileyebilmektedir(20). Hayvan ve insan çalışmalarında, obezite ile ilişkili olarak TNF- α düzeylerinin arttığı ve IRS-1' in serin fosforilasyonu ile insülin reseptör kinaz aktivitesini azalttığı ve böylece insülin direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir(21). İnvivo ve invitro hayvan çalışmalarına göre, adiponektin kasta glukoz transportunu, kas ve karaciğerde yağ asidi oksidasyonunu, AMP-tarafından aktive olan protein kinaz(AMPK) yoluyla uymaktadır(16). Yine benzer çalışmalarda adiponektin mRNA ekspresyonunun obezitede azaldığı, adiponektin ile tedavi edilen farelerde ise insülin direncinin düzeldiği, yağ asidi ve enerji tüketimi ile ilişkili genlerin

ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir(22). Adiponektinin antiaterojenik ve insülin duyarlılığını artırıcı etkileri iyi bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda anti-inflamatuvar etkileri dikkati çekmektedir. Proinflamatuvar etkili sitokin olan TNF- α 'nın üretimini azaltarak İnterlökin-10(IL-10) gibi anti-inflamatuvar etkili sitokinleri uyarmaktadır(23).Genetik programlama ile uyumlu olarak Tip 2 diyabetiklerin çocuklarında adiponektin düzeyleri düşük bulunmuştur(24,25).

2.3. T2DM Genetiği

Tip 2 DM patogenezinde genetiğin önemli olduğuna yönelik kanıtlar ikiz çalışmaları sonucunda elde edilmeye başlamıştır(26). Amerika ve Danimarka verilerine göre monozigotik ikizlerin her ikisinde T2DM gelişimi sırası ile %41 ve %55 iken, dizigotik ikizlerde bu oranlar %10 ve %15' e düşmektedir. Pima yerlilerinde olduğu gibi bazı etnik gruplarda T2DM sıklığı sadece çevresel faktörler ile açıklanamayacak kadar yüksektir(27). Tip 2 diyabetiklerin birinci derece yakınlarında insülin duyarlılığı daha azdır ve ileride diyabet gelişimi sıktır(11,28). T2 DM gelişiminde sadece genetik özellikler değil diyet ve egzersiz gibi çevresel faktörler de önem taşımaktadır. Farklı kültürel ve coğrafik alanlarda yaşayan akraba topluluklarındaki diyabet prevalansının farklı oluşu buna örnek gösterilebilir(29).

Genetik özelliklere göre T2DM, monogenik ve poligenik olarak ikiye ayrılabilir. Monogenik formlar, tek bir gendeki nadir mutasyonlar sonucu ortaya çıkan, belirli klinik ve fenotipik özellikler gösteren T2DM formlarıdır. Fenotipik penetransı yüksektir, genotip/ fenotip oranı 1' e yakındır. Genetik faktörler patogenezinde önemli rol oynadığı için hastalığın kliniği çevresel faktörlerle çok az değiştirilebilir. MODY(maturity onset diabetes of the young) monogenik T2DM formuna bir örnektir(26).

Poligenik ya da multifaktöriyel T2DM, pek çok farklı genin ve çevrenin karşılıklı etkileşimi sonucu ortaya çıktığı için klinik görünümü de daha karmaşık ve heterojendir. Bu karmaşık genetik yapının incelenmesi T2DM patogenezinin

aydınlatılması, diyabet ve komplikasyonların gelişimi açısından riskli bireylerin belirlenmesi, genom-ilaç etkileşimlerinin aydınlatılarak hastaların etkin bir şekilde tedavi edilebilmesi için önemli bilgiler sağlayabilir.

Monogenik bozuklukların tersine poligenik T2DM' ta hastalığa yatkınlık oluşturan ve hastalık oluşumundan koruyan allelleri ortaya çıkarma konusunda bazı zorluklar bulunmaktadır. T2DM, patogenez açısından ortak mekanizmaları paylaşabildiği diğer bozukluklar ile sıklıkla birlikte bulunmaktadır. Hastalığın teşhisi için genetik ve çevrenin uzun süre etkileşimi söz konusudur. Gen-gen ve gen-çevre arasında oldukça karmaşık bir etkileşim vardır ve tam olarak çözümlenmesi oldukça zorlayıcıdır.

T2DM genlerinin keşfinin ilk basamağında, araştırmacılar diyabet ile ilişkili olabilecek genleri tanımlamak için linkage(bağlantı) analiz temeline dayalı teknikleri kullandılar. Bu yaklaşım göreceli olarak küçük aile çalışmalarında güçlü etkileri olan genleri keşfetmek için uygundu.

Glukoz transportu, β hücre fonksiyonu, insülin sekresyonu ile ilişkili genlerin diyabet gelişiminde aday genler olabileceği düşünülmüştür. Her bir aday genin allel sıklıkları diyabetik olgu ve kontrol gruplarında kıyaslanarak, fazla ekprese edilip edilmedikleri araştırılmıştır. Bu çalışmalar kullanılarak günümüze kadar diyabet ile ilişkisi kesinleşmiş 4 gen saptanmıştır. Bu 4 genden biri PPAR γ 2 genidir. PPAR γ gen kodon 12 de prolin-alanin değişimi (Pro12Ala), T2DM ile ilişkisi kesin olarak gösterilmiş ilk genetik polimorfizmlerden biridir(26,30). Linkage analiz çalışmalarını, bugün devam etmekte olan büyük genom çalışmaları izlemiş ve diyabet ile ilişkili farklı genler ortaya çıkarılmıştır.

2.4. Diabetes Mellitus Tanısı

75 gr glukoz ile oral glukoz tolerans test(OGTT) diyabet tanısında açlık plazma glukozu(APG)' dan daha duyarlı ve daha özgül bir testtir. Amerikan

Diyabet Birliği(ADA)' ne göre gebe olmayan erişkinlerde diyabet tanısı için şu kriterler olmalıdır (1) ;

1. APG ≥ 126 mg/dl (Açlık en az 8 saat kalori alınmamak şeklinde tanımlanmaktadır), veya
2. hiperglisemi semptomları ve rastgele plazma glukoz ≥ 200 mg/dl, veya
3. OGTT' de 2. saat plazma glukoz ≥ 200 mg/dl

OGTT sabah saatlerinde 3 gün diyet kısıtlaması yapmadan (>150 gr karbonhidrat/gün) yapılmalıdır. Test öncesinde en az 8 saat açlık dönemi olmalıdır ve bu dönem içerisinde kişiler su içebilir. Test sırasında test uygulanan kişi sigara içmemelidir. İlaçlar, uzun süreli hareketsizlik, enfeksiyon olması test sonucunu etkileyebileceği için test öncesinde bu durumlar sorgulanmalıdır.

Açlık kan rneği alındıktan sonra kişi 75 gr anhidrz glukoz zltisini (150-300 ml su içinde) 5 dakika içerisinde içmelidir. Diyabet tanısı için kan rneklelerinin açlık ve yüklemenin 2. saatinde alınması yeterlidir.

2.5. İD' nin Düzeyinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

glisemik-hiperinsülinemik klemp test, İD' in kesin ve direkt olarak ölçümünde altın standart olmasının yanında invaziv ve zaman alıcı bir yöntemdir. İntravenöz glukoz tolerans test de bu amaçla kullanılabilir. Fakat uygulaması zaman alıcıdır ve sık kan örnekleme gerektirmektedir. Bu tekniklerin büyük ölçekli populasyon çalışmalarında veya rutinde kullanılması uygun değildir. Bu nedenle uygulanabilirliği daha kolay olan indeksler geliştirilmiştir, fakat bunların hiçbiri İD tanısında standart hale gelmemiştir ve kısıtlayıcı yönleri bulunmaktadır(31,32).

Validasyonu yapılmış bu indekslerden biri olan Homeostasis model assessment of insulin resistance(HOMA-IR) ilk kez 1985' de tarif edilmiş ve o tarihten itibaren özellikle de büyük populasyon çalışmalarında yaygın olarak

kullanılmıştır. İD' nin düzeyini değerlendirmek için HOMA-IR hesaplanırken açlık glukoz ve açlık insülin düzeyi gerekmektedir. Şu formül ile hesaplanmaktadır;
HOMA-IR= [açlık insülin (IU/mL) x açlık glukoz(mmol/L)] / 22.5
(mg/dl' yi mmol/L' ye dönüştürmek için glukoz değeri 18 ile bölünür)

2.6.1. PPAR Ailesi

Peroksizom, hücre metabolizmasında çok önemli rolü olan bir organeldir. Peroksizom enzimleri, yağ asidi oksidasyonu, gliserolipidlerin ve kolesterolün biyosentezi, reaktif oksijen türevlerinin metabolizması gibi pek çok anabolik ve katabolik enzimatik yolda görev almaktadır. Kemirgenlerde çeşitli kimyasal maddelere yanıt olarak karaciğer ve daha az oranda kalp ve böbrekte peroksizomların sayısı ve boyutunda artış olduğu saptanmıştır. Kemirgenlerdeki bu peroksizom proliferasyonuna hepatomegali, yağ asitlerinin peroksizomal ve mikrozomal oksidasyonunda rol alan genlerin transkripsiyonunda artış, trigliserid ve kolesterol düzeylerinde düşüşü içeren lipid metabolizmasında değişikliklerin eşlik ettiği gözlenmiştir. 1990' da Isseeman ve Green peroksizom proliferatörleri tarafından aktive edilen fare orphan reseptörü klonladılar ve bu reseptörlere peroksizom proliferatörleri tarafından aktive olan reseptör (PPAR) adı verildi. Daha sonra bu reseptörlerin 3 tipi tanımlandı; PPAR- α , PPAR- δ ve PPAR- γ (33).

PPAR- γ , PPAR- α ve PPAR- β/δ ile birlikte ligandla aktive olan transkripsiyon faktörlerinin alt tiplerini oluşturur. Yapıları birbirlerine çok benzemekle birlikte, her birinin ekspresyon paterni ve biyolojik etkisi farklılıklar göstermektedir (34,35) Her üç reseptör tipinin endojen ligandları; araşidonik asit metabolitleri ve diyetel yağ asidi deriveleridir.

PPAR- α ' nın lipid metabolizmasında önemli rolü vardır. Serbest yağ asitlerinin hücre içine alınması, β -oksidasyonu ve kolesterol transferinde görev alan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenler. Bunlarla paralel olarak antiinflamatuar etkilerinin de olduğu gösterilmiştir(34). En çok

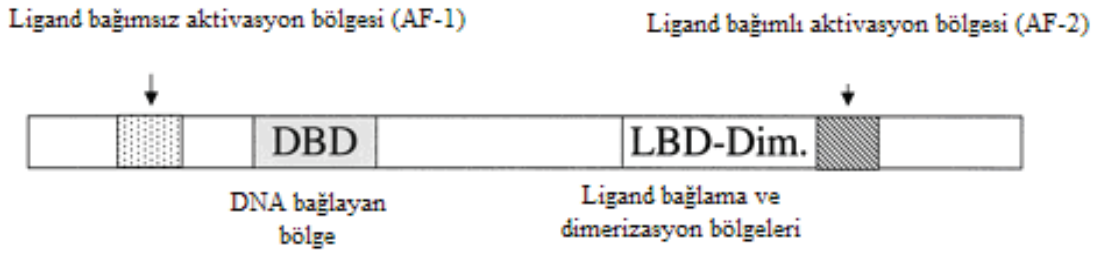
kahverengi yağ dokusu, karaciğer, böbrek korteksi, barsak mukozası ve kalp gibi yağ asidi metabolizması hızlı olan dokularda eksprese edilir(36,37) Araşidonat metabolitleri ve doymamış yağ asitleri, PPAR- α ' nın doğal ligandıdır ve üç PPAR subtipi içinde yağ asitlerine karşı en yüksek affiniteyi PPAR- α gösterir. Doymuş yağ asitlerine olan affinitesi ise daha düşüktür. Fibrat grubu hipolipidemik ilaçlar PPAR- α ' nın sentetik ligandıdır (37, 38)

Vücutta her yerde eksprese edilebilen PPAR- δ ' nın fizyolojik rolü çok iyi bilinmemekle birlikte, bu konuda son yıllarda yapılmış çalışmalar, blastokist implantasyonu, hücrelerin diferansiyasyonu, organogenez, yara iyileşmesi, makrofajlardaki lipid transportu, yağ asidi katabolizması ve enerji dengesinde rollerinin olabileceğine dikkat çekmektedir(34,37). PPAR- γ pek çok dokuda fakat en çok yağ dokusunda eksprese edilir ve oral antidiyabetik ilaç sınıfından olan tiazolidinedion(TZD) tarafından aktive edilir. Adiposit diferansiyasyonu ve metabolizmanın düzenlenmesinde, inflamasyon ve aterosklerozda önemli rolleri vardır (35).

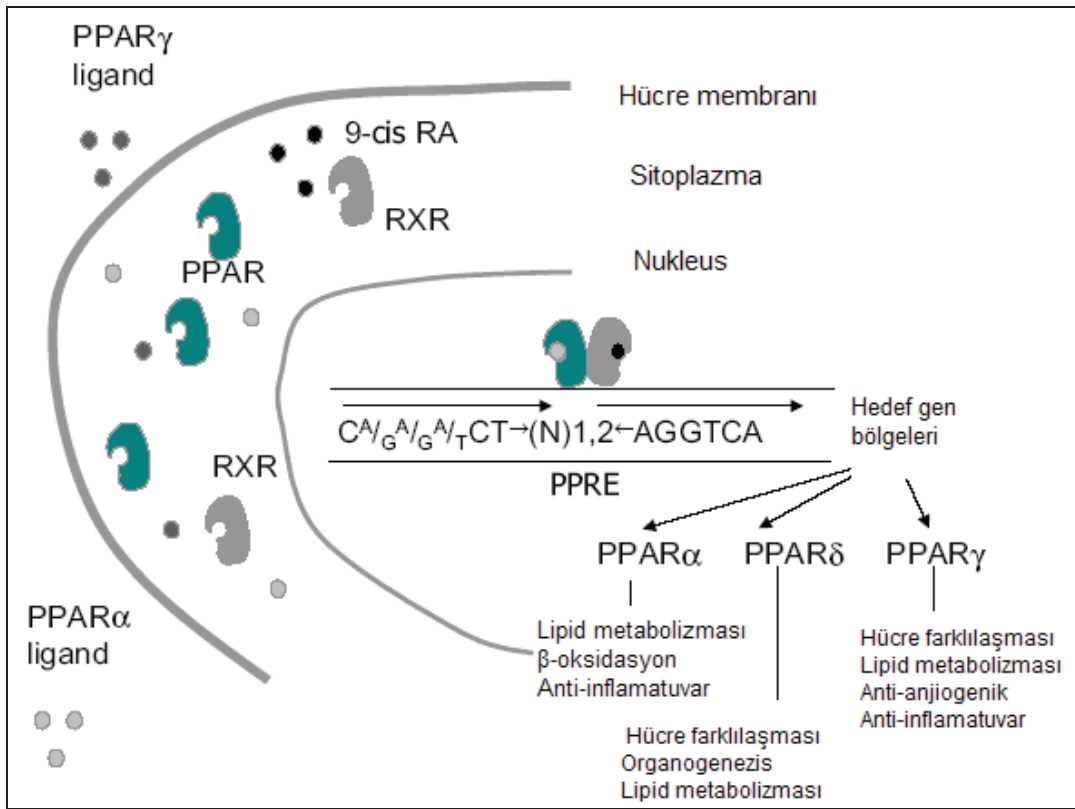
2.6.2. PPAR- γ Yapısal Özellikleri ve Biyolojik Etkileri

PPAR- γ ' nın yapısal özellikleri diğer nükleer reseptörlerle benzerlik göstermektedir(38). Ligand bağımsız transkripsiyon aktivasyon fonksiyonunu (AF-1) taşıyan N- terminal A/B bölgesi , DNA bağlayan bölge ve ligand bağımlı aktivasyon fonksiyonu (AF-2) gösteren ligand bağlayıcı C terminal bölgesinden oluşurlar(Şekil 2). DNA bağlayan bölge, hedef genin promotorlarındaki spesifik bağlanma yerleri ile etkileşimi kolaylaştıran iki parmaklı çinko motif içerir(39).

PPAR γ aktive olduktan sonra retinoid X reseptör (RXR) ile heterodimer oluşturur(34). RXR de PPAR γ ile benzer şekilde ligand ile aktive edilen bir transkripsiyon faktörüdür. Heterodimerik yapı nükleus içine geçişi sağlar ve bundan sonra hedef genin promotor bölgesinde yer alan PPRE'e bağlanırlar. Bu süreç hedef genin transkripsiyonunu aktive eder(Şekil 2).



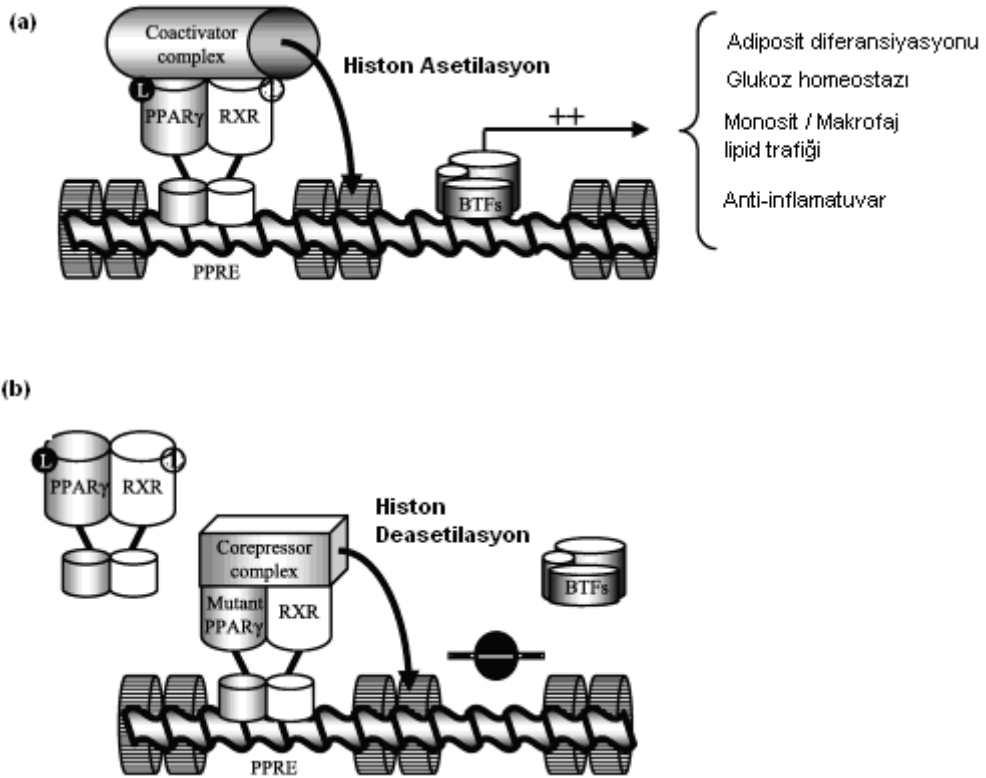
Şekil 2. PPAR' ların genel yapısı. (Kaynak 38' den değiştirilerek alınmıştır)



Şekil 3. PPAR/RXR kompleksi - Gen ekspresyonu regülasyon mekanizmaları. 9-cis RA: 9-cis retinoik asid, PPRE: peroxisome proliferator response element (Kaynak 34' den değiştirilerek alınmıştır).

Ligand yokluğunda PPAR γ /RXR dimer, transkripsiyonel açıdan aktif değildir, fakat DNA' ya bağlanabilme özelliği gösterir. Ligandın olmadığı bu durumda PPAR γ /RXR, korepresor adı verilen çeşitli yardımcı transkripsiyonel proteinlerle etkileşime girer. Bu korepresor proteinler (N-Cor, SMRT, vd), histon modifiye edici etki gösterirler ki; bu özellik transkripsiyonel olarak inaktif formda lokal kromatin konfigürasyonunun sürdürülmesinde önemlidir. TZD veya diğer

bir agonistin PPAR γ ' ya bağlanması reseptörün yapısında, korepresore affinitesinin azalmasıyla sonuçlanan değişikliğe neden olur. Bu değişiklik sonrası diğer yardımcı transkripsiyonel proteinler olan koaktivatörlere karşı affinite artar. Steroid reseptör koaktivatör(SRC) ailesinden olan P300, SRC1 veya CBP gibi koaktivatörlerin, PPAR hedef geninin transkripsiyonel aktivitesini artıran çeşitli fonksiyonları bulunmaktadır (Şekil 4). Bazı koaktivatörler histon asetilaz etkisine sahiptir. Bu etki, lokal kromatin yapısının daha açık ve daha aktif forma değişimini sağlar. Ayrıca koaktivatörler reseptör ve RNA polimeraz kompleksi arasındaki etkileşime aracılık edebilir.



Şekil 4. PPAR γ etki mekanizması. (a) PPAR γ -RXR heterodimer yapıya ligand(L) eklenmesi koaktivatör protein kompleksinin yapıya katılmasını sağlar. Farklı fizyolojik süreçleri düzenleyen hedef genlerin transkripsiyonu düzenlenir. (b) Ligandsız durumda PPAR γ /RXR dimerinin korepresor proteinlerle etkileşimi hedef gendeki transkripsiyonu engeller. Negatif etkili PPAR γ mutantları da benzer şekilde etki gösterir. RXR ile dimer yapı oluşturur fakat ligand ile bağlanamaz, böylece hedef gen transkripsiyonu engellenir. BTF, bazal transkripsiyon faktörü (Kaynak 37' den değiştirilerek alınmıştır).

2.6.2.a. PPAR- γ ve Adipogenenez

PPAR- γ , yağ hücrelerinin oluşumu ve fonksiyonunda ilk ve önde gelen esas düzenleyicidir. Beyaz ve kahverengi yağ dokusunda fazlaca eksprese edilir ve özellikle yağ hücrelerinin diferansiyasyonunda önemlidir. PPAR- γ , adiposit diferansiyasyonunun düzenlenmesinde diğer transkripsiyon faktör ailesinden olan C/EBP(CCAAT/enhancer binding protein) ve SREBP(sterol regulatory element binding protein)' ler ile birlikte çalışır. Adipogenez sürecinde tüm bu transkripsiyon faktörlerinin sinerjistik etkileşimi söz konusudur (40). Adipogenezle ilişkili süreçler hakkındaki bilgiler daha çok hücre kültürleri ile yapılmış çalışmalardan elde edilmiştir. Bu çalışmalarda, PPAR- γ ' nın, preadipositlerin adipositlere dönüşümünü sağladığı (41), PPAR- γ ekspresyonu sonrasında fibroblastların adipositlere spesifik genleri eksprese ettikleri ve matür bir adipositteki hücresel özellikleri geliştirdikleri (42) gözlenmiştir. PPAR- γ geni etkisiz hale getirilmiş (knockout) farelerde adipoz dokunun gelişmediği, (43, 44), heterozigotlarda yağ depolarının azaldığı (45) ve PPAR- γ taşımayan embriyonik kök hücrelerin adipositlere farklılaşamadıkları (44) gösterilmiştir. Ratlarda, PPAR- γ ' nın spesifik aktivasyonu ile preadipositlerin küçük adipositlere dönüşerek diferansiye oldukları gözlenmiştir(46). İnsan çalışmaları da PPAR- γ ' nın adipogenezdeki rollerini desteklemiştir. İnsan pre-adiposit kültürüne Tiazolidinedionlar (TZD) gibi PPAR- γ aktivatörlerinin eklenmesi diferansiye olmalarına neden olmaktadır(47). Ayrıca subkutan yağ dokusunun, TZD' lara visceral yağ dokusundan daha hızlı cevap verdiği gösterilmiştir. Bu bulgu, TZD' lar ile tedavi edilen Tip 2 diyabetik hastalarda visceral yağ dokusunun azalması ya da aynı kalmasına karşılık subkutan yağ dokusunun artışı açıklanmaktadır.

PPAR- γ , yağ asidi transportu ve metabolizmasında görev alan, adiposit yağ asidi bağlayan protein (FABP), fosfoenolpirüvat karboksikinaz, Açıl-CoA sentaz, yağ asidi transport protein (FATP), yağ asidi translokaz (CD36), lipoprotein lipaz gibi pekçok enzimin gen transkripsiyonunu düzenler(36). PPAR- γ ' nın adiposit diferansiyasyonu sürecinde antimitotik etki de gösterdiği

düşünülmektedir. Diğer hücreler üzerinde de antiproliferatif etkisinin olduğuna yönelik çeşitli kanıtlar vardır(38).

2.6.2.b. PPAR-γ' nın İnsülin Duyarlılığına Etkileri

TZD' lar özellikle iskelet kasında insülin duyarlılığını artırarak etki gösterirler. PPAR- γ' nın insülin duyarlılığında etkili olduğunun anlaşılması da, TZD' lerin bu reseptörün özgül ve güçlü birer aktivatörü olduklarının gösterilmesi ile olmuştur. PPAR-γ, yağ dokusunda çok yaygın bulunmasına rağmen, insülin duyarlı glukoz kullanımında önemli bir doku olan iskelet kasında neredeyse hiç saptanamayacak düzeylerde ekprese edilmesi ilginç bir noktadır. Burada önemli bir soru yağ dokusu ile periferik insülin duyarlılığı arasındaki ilişki ve PPAR- γ aktivasyonunun insülin duyarlılığına etkisinin nasıl gerçekleştiğidir. Kas dokusunun tersine, PPAR- γ'nın yağ dokusunda belirgin olarak daha fazla ekprese ediliyor olması, insülin duyarlılığında PPAR-γ' nın yağ hücresindeki etkinliğinin daha önemli olduğunu düşündürmektedir. Yağ dokusu bulunmayan farelerde TZD' ların antidiyabetik etkilerine karşı direnç gözlemlenmesi (48) bu görüşü desteklemektedir.

PPAR- γ ' nın insülin duyarlılığındaki etki mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir;

1. Yağ dokusu, iskelet kası ve karaciğer arasındaki serbest yağ asidi akışının dengelenmesi: Dolaşımdaki serbest yağ asitleri insülin duyarlılığında önemli bir belirleyicidir. Çeşitli çalışmalarda, TZD' ların antidiyabetik etkinliğinin dolaşımdaki yağ asidi düzeylerini düşürmeleri ile paralel olduğu gösterilmiştir. PPAR-γ aktivasyonu, serbest yağ asidi metabolizmasında görevli enzimlerin gen ekspresyonunu düzenleyerek serbest yağ asidlerinin matür adipositlerde depolanmasını sağlamaktadır. Bu süreç birkaç basamakta gerçekleşir. PPAR-γ aktivasyonu ile adiposite özgül lipoprotein lipazın daha fazla ekspresyonu sonucu dolaşımdaki lipoproteinlerden serbest yağ asidi salınımı artar. Eş zamanlı olarak, CD36 ve yağ asidi transport proteini gibi yağ asidlerinin hücre

içine geçişini sağlayan transporterlerin adiposit yüzeyindeki sayılarında artış meydana gelir. Yağ asidlerinin, trigliserid(TG) şeklinde depo edilmelerinde rolü olan enzimlerin (gliserol kinaz, fosfoenolpirüvat karboksikinaz) ekspresyonları artar. Bunun sonucunda da yağ asidleri daha çok adipositlerde depolanacağı için sistemik dolaşıma geçişleri azalır. Böylece serbest yağ asidlerinin lipotoksisiteyi uyarabildikleri karaciğer ve iskelet kasında değil, yağ dokusunda depo edilmeleri sağlanmış olur (37, 38)

2. Adipokin salınımının düzenlenmesi: PPAR- γ , adipokin adı verilen ve önemli metabolik etkileri olan adiposit kökenli hormonların transkripsiyonunu düzenleyerek insülin duyarlılığı üzerine etkili olur. Resistin yağ dokusundan salınan ve kastaki insülin direncine katkısı olduğu düşünülen bir proteindir. Resistin ekspresyonunu TZD' ların azalttığı gösterilmiştir(38). Diğer bir adipokin olan tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) insülin direncine neden olan önemli bir sitokindir. İnsülin reseptör sinyal iletimini bozar, lipoprotein lipazı inhibe eder ve yağ dokusunda lipolizi artırır. Böylece dolaşımda yağ asidi düzeylerini artırarak kas dokusunda insülin direncine yol açar(38). PPAR- γ ligandlarının, TNF- α nın insülin reseptör sinyal iletimine olumsuz etkisini birkaç farklı mekanizma ile engellediğine yönelik, önemli bir bölümü hayvan çalışmalarından elde edilmiş kanıtlar vardır. Bu mekanizmalardan birincisi; TZD' lerin TNF- α düzeylerini azaltmaları, ikincisi; TNF- α ' nın insülin reseptörü ve onun substratı olan IRS-1' i inhibe etmesini engellemeleri ve üçüncüsü ise; adipositlerde PI3-kinazın p85 subunitini ve IRS-2 ekspresyonunu artırmalarıdır(9). TZD' ler insülin direnci gelişiminde rolleri olan moleküllerin ekspresyonunu azaltırken, insülin etkisini artırdığı bilinen adiponektinin düzeylerini artırır(37,38,49). Dolaşımdaki adiponektin düzeyleri insülin duyarlılığı ile yakından ilişkili, fakat özellikle visceral yağ dokusu artışı ile ters orantılıdır. Bu sonuç, PPAR- γ aktivasyonu ile insülin duyarlılığı arasındaki ilişkiyi göstermesi açısından adiponektinin önemini vurgulamaktadır.

3. *Glukoz kullanımının artırılması:* PPAR- γ ' nın, yağ dokusunda insülin sinyal iletim yolağı üzerine direkt etkileri ile GLUT4 transporterleri artırarak glukozun hücreye girişini ve kullanımını artırdığı düşünülmektedir(37,38)

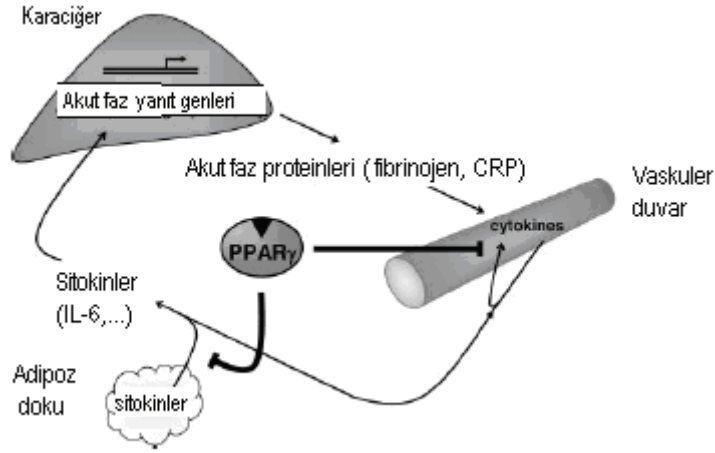
4. *Yağ dokusunda 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaz tip I aktivitesinin düzenlenmesi:* Yağ dokusunda lokal kortizol oluşumu visceral obezitede insülin direnci gelişimine katkıda bulunan faktörlerden biridir. 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaz tip I (11 β -HSD I), karaciğer ve yağ dokusunda inaktif kortizondan aktif kortizol üretimine ve böylece kortizol ile uyarılmış adiposit diferansiyasyonuna neden olur. PPAR- γ ligandlarının adiposit 11 β -HSD I ekspresyon ve aktivitesini azalttığı gösterilmiştir(37)

2.6.2.c. PPAR- γ ' nın Vasküler Etkileri

Hipertansiyon insülin direnci ile yakından ilişkilidir ve genel populasyon ile kıyaslandığında Tip 2 diyabetik hastalarda 1,5-2 katı daha fazla sıklıkta görülmektedir. PPAR- γ 'da fonksiyon kaybına yol açan mutasyon taşıyan kişilerin önemli bir kısmında erken başlangıçlı hipertansiyon önemli bir bulgudur. Diyabetik olmayan hipertansif kişilerde TZD tedavisinin kan basıncında ılımlı azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. PPAR- γ ' nın kan basıncının regülasyonundaki olumlu etkisinin insülin duyarlılığından bağımsız olduğu, düz kaslarda kalsiyum kanallarının blokajı, endotelin-I salınımının inhibisyonu ile vasküler tonusu direkt olarak regüle edebileceği düşünülmektedir(37).

PPAR- γ ' nın ateroskleroz patogenezinde de önemli rolünün olabileceği düşünülmektedir. Dolaşımdaki glukoz ve lipid düzeylerine etkisi ile kalp metabolizmasını indirekt, makrofaj fonksiyonları ve köpük hücresi oluşumundaki değişiklikler ile de aterogenez üzerine direkt etkili olabileceği bildirilmiştir(34) Hayvanlarda, PPAR- γ aktivatörleri ile hiperkolesterolemi ilişkili aterosklerotik plak gelişiminin azaldığı(50), endotelden nitrik oksit (NO) üretim ve salınımının arttığı gösterilmiştir(51). PPAR- γ aktivasyonu sonucu yağ dokusundaki iyileşmeyle bağlantılı olarak dolaşımdaki interlökin-6(IL-6), TNF- α , plazminojen

aktivatör inhibitör-1(PAI-1) gibi inflamatuvar faktörlerin düzeylerinin azalması karaciğer ve damarda indirekt antiinflamatuvar ve antikoagülan etkiler oluşturabilir(Şekil 5)(52).



Şekil 5. Adipoz dokuda PPAR γ aktivasyonu karaciğer ve damarda indirekt anti-inflamatuvar etki oluşturabilir. (Kaynak 52' den değiştirilerek alınmıştır)

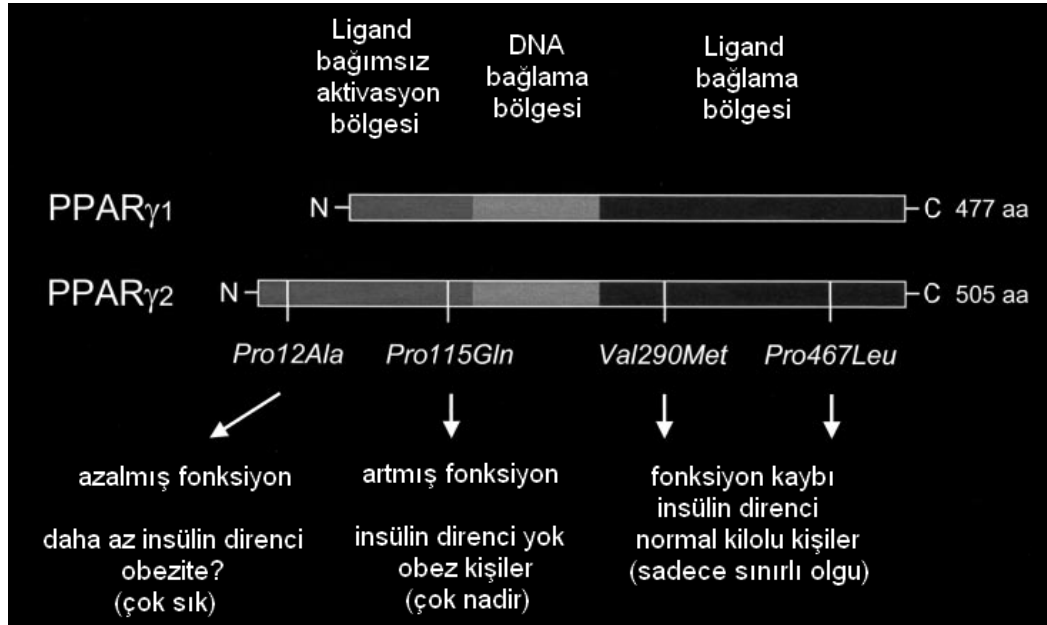
2.6.3. PPAR- γ 2 Gen Polimorfizmi ve Etkileri

PPAR- γ ' nın etkileri PPAR γ 1 ve PPAR γ 2 izoformları aracılığı ile gerçekleşir. PPAR γ 1 yaygın olarak eksprese edilmesine rağmen PPAR γ 2' nin ekspresyonu daha çok yağ dokusundadır. Bu izoformlar tek gen tarafından kodlanır, PPAR γ 1' den farklı olarak PPAR- γ 2, aminoterminal bölgede 30 (farelerde 28) amino asitlik ilave bölgeye sahiptir. Bu nedenle PPAR γ 1'e göre 5-6 kat fazla ligand bağımsız aktivite gösterir(53). İnsülin hem PPAR γ 1 hem de PPAR γ 2' nin ligand bağımsız aktivitelerini uyarırken, obezite ve nütrisyonel faktörler ise yalnızca PPAR γ 2' nin insan yağ dokusundaki ekspresyonunu etkiler (54).

En yaygın görülen PPAR- γ genetik varyantı mutasyon PPAR- γ 2' de pro12ala polimorfizmidir (Şekil 6)(55). İlk kez 1997'de identifiye edilmiştir(56).

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. Ala12 allelin sıklığı etnik farklılıklar göstermektedir. Beyaz ırkta %12, Amerikan yerlilerinde %10, Japonlarda %4, Latin Amerikalılar' da %23, Afrika kökenli Amerikalılar' da %3 sıklıkta bildirilmiştir (55,57)

Daha önce değinildiği gibi 30 aminoasitlik bu ilave bölge PPAR- γ 1' e göre PPAR- γ 2'nin transkripsiyonel aktivitesini 5-6 kat artırmaktadır. Pro12Ala polimorfizminin PPAR- γ 2 yapısı üzerine tam etkisi bilinmemekle birlikte, PPAR- γ 2 nin PPRE' e affinitesinin yarıya yakın azaldığı ve bunun da reseptörün transkripsiyonel aktivitesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir(54).



Şekil 6. 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 55' den değiştirilerek alınmıştır)

PPAR γ 2 gen Pro12Ala polimorfizminin insülin duyarlılığı ve T2DM gelişimi ile ilişkisini araştırmaya yönelik yapılan çalışmalarda çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Çoğunluğunda Ala12 allelinin T2DM ve insülin direnci gelişimini

engelleiyici (58,59,60,61,62,63) ve kardiyak hastalık sıklığını azaltıcı etkisi gösterilmiştir(64,65). İnvitro çalışmalarda bu allelin PPAR γ DNA bağlama ve transkripsiyon aktivitesini azalttığı bildirilmiştir(66). Ateroskleroz gelişiminin erken dönem izleminde değerli bir yöntem olan(67) ultrasonografik karotis arter intima media kalınlığı(IMK) ölçümü ile, diyabet riski taşıyan bireyler değerlendirilmiş, Ala12Ala genotipi taşıyanların İMK' nin daha düşük olduğu gösterilmiştir(68). Pro12Pro genotipi hakkındaki genel kanı İD ve T2DM riski ile ilişkili olduğudur(69). STOP-NIDDM çalışmasında Pro12Pro genotipinin, bozulmuş glukoz toleransının T2DM' a ilerlemesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir(70). Bazı çalışmalarda Pro12Ala polimorfizmi ile T2DM etiyolojisi arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Bunun nedenini bu çalışmalardaki olgu sayısının az olması ile açıklanmıştır. Çünkü büyük olgu gruplarıyla yapılan çalışmalarda Pro12Ala polimorfizminin T2DM riskini azalttığı bildirilmiştir(71).

PPAR- γ 2 genotipinin beden kitle indeksi (BKİ) üzerine etkileri ise yeterince açık değildir(39). Beamer(72), Pro12Ala allelin, artmış BKİ, bel çevresi ve bel-kalça oranı, Deeb ve arkadaşları(54) ise azalmış BKİ ve artmış insülin duyarlılığı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Ek ve arkadaşları(73), gen polimorfizminin obezite derecesine göre farklı etkileri olduğunu göstermiştir. Ayrıca PPAR- γ gen polimorfizimleri, insülin direnci ve adipogenez arasındaki kompleks ilişkide BKİ ve ırksal farklılıkların da etkisi olabilir(74). Çeşitli çalışmalar Ala12 allel varlığının, egzersiz azlığı ve yüksek yağ içerikli beslenme gibi olumsuz çevre etkilerine karşı koruyucu olduğunu düşündürmüştür(39). Pro12 allel taşıyan obez diyabetiklerin, en az bir Ala12 allel taşıyanlardan daha fazla insülin direncine sahip oldukları, fakat sağlıklı kontrol grubunda ise böyle bir etkinin olmadığı gösterilmiştir(58). Diğer bir çalışmada, beyaz ırkta Ala 12 allel varlığının adiposite ve İD arasındaki olumsuz ilişkiyi azalttığı bildirilmiştir (75).

Toplam 19136 kişilik 30 farklı çalışmanın değerlendirildiği bir metaanaliz sonucuna göre BKİ>27 kg/m² olanlarda Pro12Ala polimorfizmi ile BKİ arasında ilişki saptanırken BKİ<27 kg/m² olanlarda saptanamamıştır. Bu bulgu Pro12Ala

polimorfizminin BKİ' ne etkisinin obez bireylerde olduğunu göstermektedir(76). Pro12Ala polimorfizminin obez ve zayıf kişilerin BKİ' lerindeki farklı etkileri bu genetik varyantın etkisinin çevresel etkiler ve / veya genetik faktörler ile modifiye edildiğini düşündürmektedir(77). Şimdiye kadar bildirilen çalışma sonuçlarının da birbiri ile çelişmesi bununla açıklanabilir.

Pro12Ala mutasyonunun insülin direnci gelişim süreçlerine olan etkisinin hangi mekanizmalar aracılığı ile olduğu araştırılmıştır. Pro12Ala PPAR- γ 2' nin yağ dokusuna lokalize ekspresyonu, yağ dokusunun insülin duyarlılığındaki önemini vurgulamış, fakat bu mutasyonun karaciğer, kas ve metabolizma ile ilişkili diğer dokulardaki etkisi tam olarak anlaşılammıştır(39). Pro12Ala mutasyonunun obezite ve insülin duyarlılığı üzerine olan farklı etkisi, adipokin düzeylerinde meydana getirdiği değişimler nedeni ile olabilir. Finli genç erkeklerin katıldığı ve PPAR- γ 2 ve IRS-1 gen polimorfizmlerinin serum adiponektin düzeylerine etkisini araştıran çalışmada Pro12Ala genotipi taşıyanların adiponektin düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır(78).

Tip 2 diyabetik kişilerin birinci derece yakınlarında, diyabet açısından aile öyküsü olmayanlara göre PPAR- γ 2 Pro12Ala polimorfizminin daha düşük olduğu gösterilmiştir(79). Tip 2 diyabetiklerin çocuklarında, Pro12Ala allel taşıyan bireylerin insülin duyarlılığının daha fazla olduğu bildirilmiştir(80). Tip 2 diyabetiklerin birinci derece yakınlarının katıldığı benzer bir çalışmada, Pro12Ala polimorfizmi sadece obez olan grupta, artmış insülin duyarlılığı ile ilişkili bulunmuştur(81). Tip 2 diyabetiklerin yakınlarının katıldığı diğer bir çalışmada ise, Pro12Ala polimorfizmi ile metabolik sendrom bileşenleri olan BKİ, serum trigliserid ve glukoz düzeyleri, kan basıncı ile ilişkili bulunmuş, fakat diyabet gelişimi üzerine etkisi gösterilememiştir (82).

3. YÖNTEM ve GEREÇLER

3.1. Hasta ve Kontrol Grubununun Seçimi

EÜTF Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Polikliniği' ne rutin sağlık kontrolü için başvuran, Tip 2 diyabet açısından AÖ pozitif, yaşları 18-35, BKİ değerleri 18,6 -27 kg/m² olan, non-diyabetik kişilerle, kontrol grubu olarak diyabet açısından aile öyküsü olmayan, araştırma grubu ile benzer yaş, cinsiyet ve BKİ' ne sahip non-diyabetik kişiler çalışmaya dahil edildi. Ebeveyninin her ikisi veya ebeveyninden birisi ile birlikte, birinci veya ikinci derece akrabalarından en az birisinde önceden tanı almış T2DM olanlar aile öyküsü açısından pozitif kabul edildi. Kontrol grubu ise birinci ve ikinci derece akrabalarının hiçbirisinde T2DM tanısı olmayan kişilerden oluşturuldu. İskemik kalp hastalığı, hipertansiyon, periferik arter hastalığı, akut ve kronik enfeksiyon ve ciddi herhangi bir hastalık öyküsü olan, karbonhidrat, lipid metabolizmasını etkileyen ilaç kullanan kişiler çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmaya dahil edilenlerin tümüne fizik muayene ve antropometrik ölçümler yapıldı, rutin sağlık kontrolü için hastanemizde yapılmış olan biyokimyasal test sonuçları kaydedildi. Olguların tümünde FT4 ve TSH bakılarak ötiroid oldukları gösterildi. 75 gr glukoz ile OGTT uygulanarak ADA kriterlerine göre nondiyabetik olanlar; AÖ olan grupta 104 kişi (77 kadın, 27 erkek), AÖ olmayan grupta 91 kişi (48 kadın, 43 erkek) çalışmaya devam etti. Genetik analiz ve serum adiponektin düzey ölçümü için venöz kan örnekleri alındı. Uzman radyolog tarafından ultrasonografik yöntemle karotis İMK ölçümleri yapıldı.

3.2. Antropometrik Ölçümler

Her iki grubun vücut ağırlıkları biyoelektrik empedans yöntemi (Tanita TBF 300, TANITA Corp, Tokyo, Japan) ile ölçülerek BKİ(kg/m²) değerleri, vücut ağırlığı (kg) /boy² formülünden hesaplandı. Bel çevresi için, kot kavsinin lateralinden, iliak kristaya uzanan dikey çizginin ortasından geçen çap, ekspiriumda iken ölçüldü(83). Kan basıncı, en az 10 dakika istirahatten sonra

oturur pozisyonda 30 saniye aralarla 2 kez ölçülerek, ikinci ölçüm değerlendirilmeye alındı.

3.3. Laboratuvar Tetkikleri

Araştırma ve kontrol grubuna, 12 saat açlıktan sonra, sabah saat 08:00-10:00 arasında, 75 gr glukoz ile OGTT uygulandı. Kan örnekleri bazal, 1. ve 2. saatte alınarak bekletilmeden glukoz ve insülin düzeyleri ölçüldü. Ölçümler; glukoz ölçümleri, glukoz oksidaz yöntemi ile spektrofotometrik olarak photometer 5010 cihazı kullanılarak, insülin düzeyleri için Immulite 2000 insulin assay ve Immulite 2000 analizör ile kemiluminesent immunometrik yöntem kullanılarak yapıldı. HOMA-IR değeri $\{[\text{glucose}(\text{mg/dl})/18] \times \text{insulin}(\mu\text{U/mL})\} / 22.5$ formülünden hesaplandı. Serum adiponektin ölçümü ve PPAR- γ 2 Pro12Ala polimorfizm araştırılması için ayrı bir günde, yine 12 saat açlıktan sonra sabah saat 08:00-10:00 arasında venöz kan örnekleri alındı. Adiponektin ölçümü için hazırlanan serum örnekleri ve polimorfizm çalışması için EDTA' lı tüpe alınan kan örnekleri analiz yapılana kadar -80°C ' da dondurularak saklandı. Serum adiponektin ölçümünde insan adiponektin RIA kit (Linco Research, USA) kullanıldı.

3.4. Genotip analizi- PPAR- γ gen ekzon 2, kodon 12 analizi

3.4.1. Kandan DNA İzolasyonu Aşaması

PPAR Pro12Ala polimorfizmi tayini çalışmalarındaki aşamalardan biri, periferik kandan cam lifli filtreye nükleik asit bağlama metoduna göre gerçekleştirilen DNA izolasyonuydu. Çalışmalar, ticari olarak satılan DNA izolasyonu kiti protokolüne göre yapıldı. Protokol, aşağıdaki basamaklardan oluşmaktaydı;

1. EDTA' lı tüplere alınan kandan 200 µl alınıp üzerine 200 µl bağlama tamponu ve 40 µl Proteinaz K ilave edilip, pipetle resüspanse edilerek homojenizasyon sağlandı.
2. Tüpler, önceden 72°C' ye ayarlanan kuru ısı bloğunda 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon sonunda, karışım üzerine 100 µl izopropanol eklenir ve pipetaj ile iyice karıştırıldı.
4. Eppendorf tüp içinde bulunan örneğin tamamı, 'collection' tüp içine yerleştirilmiş 'filtre' tüpünün içine pipetlendi.
5. 8.000 rpm' de 1 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 eklendi.
8. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapıldı.
9. Santrifüj sonrasında, örneklerin alt kısmı atılır ve filtreli kısım yeni 'collection' tüpe aktarıldı.
10. 500 µl yıkama tamponu eklenerek, 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapıldı.
11. Filtreli tüpler yeni collection tüplere aktarılarak ikinci kez 500 µl yıkama tamponu eklendi.
12. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapıldı.
13. Santrifüj bittikten sonra, tüplerin alt kısmında biriken süpernatant uzaklaştırılır ve 10 saniye 8.000 rpm' de santrifüj yapıldı.
14. Filtreli tüpler, yeni Eppendorf tüplere yerleştirilerek 72°C' de sabitlenmiş kuru ısı bloğunda bekleyen elüsyon tamponundan 200 µl ilave edilerek 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapıldı.
15. Santrifüj sonrasında filtreli tüp atıldı. Eppendorf tüpte kalan, genomik DNA ile bir sonraki işleme geçildi.

3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA' da dizisi bilinen herhangi bir bölgenin çoğaltılmasına (amplifikasyon) olanak veren in vitro DNA sentezi yöntemidir. PCR, 3 ana basamakta gerçekleşti;

1. Amplifiye edilecek çift iplikli DNA' nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu (denaturation)
2. Özgül hibridizasyona olanak verecek sıcaklıkta (T_m değerinin $3-5^{\circ}\text{C}$ altındaki sıcaklık) primerlerin hedef bölgelere bağlanması (annealing)
3. *Taq* DNA Polimeraz enziminin maksimal aktivite gösterdiği 72°C sıcaklıkta, zincirin primerlerden itibaren uzaması (elongation)

PCR' da yer alan bileşenler;

1. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA
2. Amplifiye edilecek kalıp DNA' nın komplementeri olacak şekilde seçilmiş yaklaşık 20 bazlık sentetik kısa tek zincirli DNA molekülleri olan oligonükleotid primer çifti
3. Termostabil karakterli *Taq* DNA Polimeraz enzimi.

Hedef bölgeye özgül uygun primer çiftinin (ileri ve geri primerler) doğru seçimi oldukça önemlidir. Primerler, genomik DNA' daki hedef bölge ile hibridize olabilen, 15-20 nükleotid uzunluğundaki sentetik oligonükleotidlerdir. Denatürasyonun ardından primerlerin bağlanma aşamasındaki T_m (erime derecesi) derecesinin saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi açısından büyük öneme sahiptir [$T_m=4^{\circ}\text{C}(\text{G}+\text{C}) + 2^{\circ}\text{C}(\text{A}+\text{T})$].

Zincirin uzama reaksiyonunu gerçekleştiren *Taq* DNA Polimeraz enzimi, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen, optimal aktivitesini 72°C ' de gösteren ve 94°C ' de bile aktivitesini kaybetmeyen bir enzimdir. *Taq* DNA

polimerazın görevi, DNA moleküllerinin komplementerleriyle eşleşmesine yardımcı olup, onların çoğaltılmasını sağlamaktır. Polimeraz enzimleri, aktivite gösterebilmek için, Mg^{2+} iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Mg^{2+} iyonları, *Taq* enziminin kofaktörü olarak işlev görürler. Bu nedenle, en uygun $MgCl_2$ konsantrasyonunun oluşturulması gerekmektedir. Magnezyum konsantrasyonunun fazla olduğu reaksiyonlarda hatalı eşleşmeler meydana gelirken, eksik olduğu reaksiyonlarda yeterli miktarda hibridizasyon gerçekleşmemektedir. Primerler ile başlatılan çift sarmal oluşumu hedef zincirin DNA polimeraz tarafından dNTP' lerin kullanılarak uzatılmasıyla devam etmektedir. dNTP' ler (ATP, GTP, TTP, CTP) *Taq* DNA polimerazın sübstratlarıdır. Zincir, tek iplikli hedef DNA'nın komplementeri primer ile başlar ve *Taq* polimeraz, ortamdaki dNTP' leri (deoksिनükleotid trifosfat) kullanarak bu zinciri uzatır. 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.

3.4.3. PPAR Pro12Ala Polimorfizminin Belirlenmesi için Gerçekleştirilen Genotip Analizi

EDTA' lı tüplere alınmış olan venöz kandan High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Germany) kullanılarak izole edilmiş genomik DNA' dan, PPAR- γ gen ekson 2 (Pro12Ala), LightCycler ver:2.0 (Roche Diagnostic) cihazı ile PCR yapılarak amplifiye edildi. PCR sonrasında elde edilen, gene ait ürün büyüklüğü 295 bç. lik bir fragmandı.. PPAR geninde Pro12Ala polimorfizmini genotiplendirmek üzere yapılan PCR reaksiyonunda kullanılan ileri ve geri primer dizileri aşağıda verilmektedir:

PPAR- γ ekzon 2 ileri primer: 5'-CTG ATG TCT TGA CTC ATG GG-3'

PPAR- γ ekzon 2 geri primer: 5'-GGA AGA CAA ACT ACA AGA GC-3'

PPAR geninin 2. eksonunda, Sitozin' in (C) Guanin' e (G) dönüşümü sonrasında, Prolin aminoasidinin Alanin' e dönüşümüne neden olan, genin 295

bç(baz çifti)' lik bir bölgesi, PCR ile çoğaltıldı. PCR amplifikasyonu için, 20 µl' lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Çoğaltılan PCR bölgesi aşağıda verilmektedir.

5'-

CTGATGCTTGA~~CTCATGGG~~TGTATTCACAAATTCTGTTACTTCAAGTCTTTTTCTTTAACG
GATTGATCTTTTGCTAGATAGAGACAAAATATCAGTGTGAATTACAGCAAACCCCTATTCCA
TGCTGTTATGGGTGAAACTCTGGGAGATTCTCCTATTGACCCAGAAAGCGATTCCCTCACT
GATACACTGTCTGCAAACATATCACAAGGTAAAGTTCCTTCCAGATACGGCTATTGGGGAC
GTGGGGGCATTTATGTAAGGGTAAAATTGCTCTTGTAGTTTGTCTTCC - 3'

3.4.4. PCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

20µl' lik PCR Reaksiyonu Karışımı:

Steril Distile Su	9,6 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µl
PPAR İleri primer (100 µM)	0,5 µl
PPAR Geri primer (100 µM)	0,5 µl
Fast Start SyberGreen Hybridisation Probes	2,0 µl
DNA	5,0 µl

PCR sonrası elde edilen ürün büyüklüğü %2' lik agaroz jel elektroforezi ile konfirme edildi.

3.4.5. % 2' lik Agaroz Jel Hazırlama

0.8 gr Agaroz, 40 ml 1xTAE (Tris-Asetat-EDTA; 1x) içine ilave edildi ve mikrodalga fırında eritildi. Tamamen homojen bir eriyik haline gelen jel ılıklaştıktan sonra, 5 µl Ethidyum Bromür (150 µl/1L 1x TAE) eklenip iyice karıştırıldı ve yükleme kuyularını oluşturacak tarağın da takılı olduğu elektroforez transfer kabına döküldü. Jelin 4 °C' de 15 dakika polimerleşmesini tamamlanması beklendi. Jel polimerize olunca, tarak çıkarıldı ve agaroz jelin bulunduğu transfer kabı elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı, jelin 1-2 mm üzerini kaplayacak şekilde 1xTAE tampon çözeltisi ile doldurulup, örnekler kuyucuklara yüklendi.

- Birinci kuyucuğa, 5 µl belirteç DNA yüklendi (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder)
- İkinci kuyucuğa, 10 µl PCR ürünü + 2 µl turuncu 6x yükleme boyası [10 mM Tris-HCl (pH 7.6), % 0.15 orange G, % 0.03 xylene cyanol FF, % 60 glyserol, 60 mM EDTA; 6x Orange Loading Dye] karışımı yüklendi
- Diğer kuyucuklar da 10 µl PCR ürünü + 2 µl 6x yükleme boyası karışımı içerecek şekilde yüklendi.

Güç kaynağı 90V\25mA olacak şekilde ayarlanarak, jele yüklenen örnekler 45 dakika yürütüldü. Sonuçlar jel görüntüleme, analiz ve dokümantasyon sistemi ile görüntülendi.

3.4.6. PPAR Pro12Ala Polimorfizm Analizi için Restriksiyon Enzim Kesimi

PPAR geninin PCR ile çoğaltılan 295 bç.' lik hedef bölgesi, *Hga I* (Fermentas) restriksiyon enzimi için tek kesim bölgesi içermektedir. Enzim kesim bölgesi aşağıda verilmektedir:

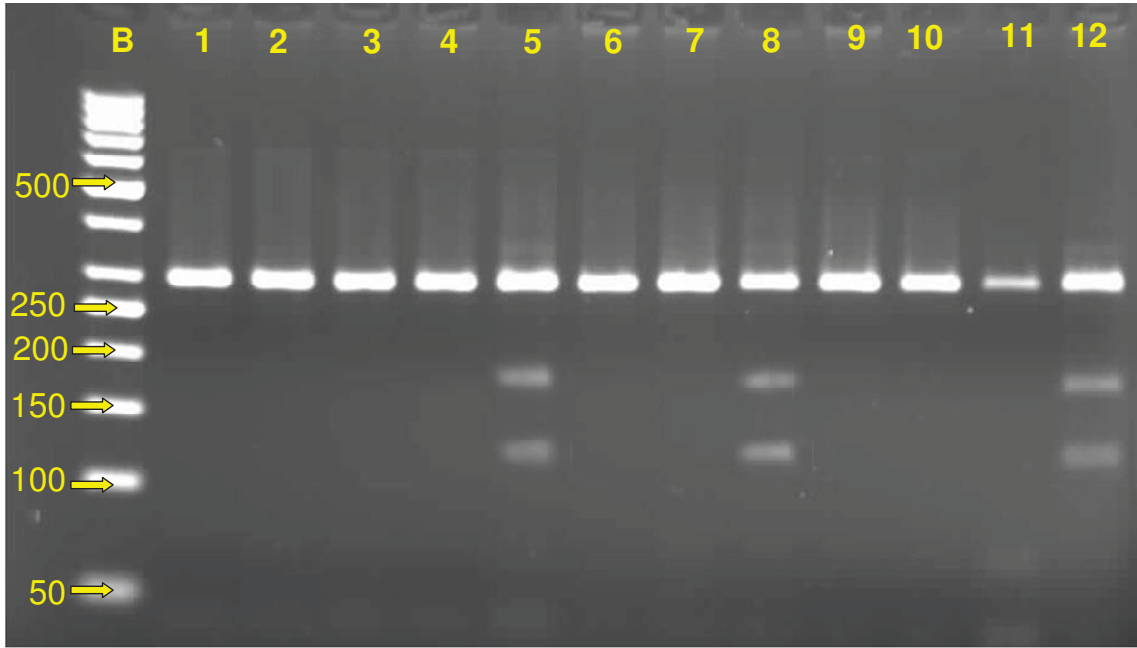
5'-
CTGATGTCTTGACTCATGGGTGTATTCACAAATTCTGTTACTTCAAGTCTTTTTCTTTTAACG
GATTGATCTTTTGCTAGATAGAGACAAAATATCAGTGTGAATTACAGCAAACCCCTATTCCA
TGCTGTTATGGGTGAAACTCTGGGAGATTCTCCTATTGACC[↓]CAGAAAGCGATTCTTCA
CTGATACACTGTCTGCAAACATATCACAAAGGTAAGTTCCTTCCAGATACGGCTATTGGGG
ACGTGGGGGCATTTATGTAAGGGTAAAATTGCTCTTGTAGTTTGTCTTCC - 3'

Enzim kesimi için hazırlanan reaksiyon karışımı:

Steril Distile Su	16,7 µl
Hga I Tamponu	3,0 µl
Hga I enzimi:	0,3 µl
PCR ürünü	10,0 µl

Karışım 37°C' de 2 saat süreyle inkübe edildi.

Eğer 12. kodonda C varsa, enzim kesimi gerçekleşmez ve 295 b.lik bir fragman elde edilir. Bu olguların genotipi CC(Pro12Pro) olarak değerlendirilir. Eğer C → G değişimi gerçekleşirse, enzim tek noktadan keser ve 178 bç.lik ile 117 bç.lik iki fragman oluşur. Enzim kesimi sonrasında 295 bç., 178 bç. ve 117 bç.lik 3 bant ayırt edilirse olgunun genotipi CG(Pro12Ala) yani heterozigot olarak değerlendirilir. Kesim sonrası sadece 178 bç. ve 117 bç. oluşursa olgunun genotipi GG(Ala12Ala) olarak değerlendirilir. Çalışmamızda hiçbir olguda GG genotipine rastlanmadı. Şekil 7' de çalışmamızdaki bazı olgulara ait örneklerin, restriksiyon enzim kesimi ve % 2'lik agaroz jel üzerinde koşullarından sonra, Pro12Ala polimorfizmi için genotiplendirilmeleri görülmektedir.



Şekil 7. Genotip analiz jel görüntüsü. B: Belirteç DNA (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; MBI Fermentas, Germany); 1,2,3,4,6,7,9,10,11 No' lu olgular yabani(wild) tip (CC) , 5,8,12 No' lu olgular heterozigot (CG) olarak değerlendirilmiştir. Polimorfik olgu (GG) saptanmamıştır.

3.5. Karotis İntima Media Kalınlığı Ölçümü

Ultrasonografik inceleme için 7.5 MHz linear-array transducer içeren Sonoline Elegra system (Siemens, erlangen, Germany) kullanıldı. Karotis IMT ölçümleri bilateral olarak arteria carotis communis orta bölümünden yapıldı.

3.6. Kullanılan İstatistik Yöntem

İstatistiksel analiz SPSS Bağımsız iki grubun karşılaştırılmasında, numerik skalada ölçülen değişkenler için T testi , Ki-Kare analizi, kovarians analizi, hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg eşitliğine uyumu, ki-kare uyum iyiliği ile incelendi. Normal dağılıma uymayan numerik verilerin analizi için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tabloda median, maksimum ve minimum değerleri verildi. İki değişken arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile incelendi.

4. SONUÇLAR

İki grup yaş ve sigara kullanımı açısından benzer dağılıma sahipti ($p>0.05$). Cinsiyet dağılımı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p=0.002$) olması nedeni ile istatistiksel analiz yapılırken cinsiyet etkisi göz önünde bulunduruldu ve düzeltme yapıldı. Cinsiyet etkisi gözlenen parametreler için değerler her iki cinse göre ayrı olarak hesaplandı. Tablo 1. de iki grubun cinsiyet, yaş ve sigara kullanımına göre dağılımları gösterilmiştir. Aile öyküsünün antropometrik ve biyokimyasal parametreler ile karotis İMK üzerine etkisi olup olmadığı incelenirken bu parametrelere olası etkileri göz önüne alınarak sigara kullanımı da istatistiksel analize eklendi.

Tablo 1. Grupların cinsiyet, yaş ve sigara kullanım özellikleri NS(Nonsignificant): $p>0.05$

	AÖ(+)	AÖ(-)	p
Cinsiyet, n(%)			
Kadın	77 (74)	48 (52.7)	0.002
Erkek	27 (26)	43 (47.3)	
Toplam	104	91	
Yaş (yıl)	24.8 ± 4.1	24.3 ± 3.2	NS
Sigara (%)			NS
İçmeyen	88 (84.7)	69 (75.8)	
İçen	16 (15.3)	22 (24.2)	

$p<0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

AÖ, Aile öyküsü

BKİ, bel çevresi, HDL-kolesterol, fibrinojen, açlık glukozu, AUC-glukoz, AUC- insülin, cinsiyet ilişkisinin, trigliserid ve adiponektin düzeyleri hem cinsiyet hem de sigara ilişkisinin gözlendiği parametrelerdi (Tablo 2). AÖ ile BKİ arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p=0.020$). AÖ bulunan kadın ve erkeklerin, AÖ bulunmayan aynı cinsten kişilere göre BKİ daha yüksekti. Yine her iki grupta BKİ, erkeklerde kadınlardan daha fazlaydı ($p<0.001$). AÖ olan kadınlarda hs-CRP düzeyleri, AÖ olmayan kadınlara göre istatistiksel

olarak anlamlı yüksek saptandı ($p<0.05$). Erkeklerde ise AÖ olanlarda hs-CRP düzeyleri olmayanlara göre daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Açlık glukoz ve AUC-glukoz açısından erkeklerde her iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanırken kadınlar arasında bu farklılık gözlenmedi. Erkeklerde AÖ bulunanların açlık glukoz ve AUC-glukoz değerleri daha yüksek bulundu (sırası ile $p<0.001$, $p<0.05$).

Her iki grupta ve her iki cinste, sigara içenlerde, içmeyenler ile kıyaslandığında trigliserid düzeyleri daha yüksek, adiponektin düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşüktü (sırası ile $p<0.05$, $p=0.002$). Erkeklerin trigliserid düzeyleri kadınlardan daha yüksek, adiponektin düzeyleri ise daha düşüktü (sırası ile $p<0.001$, $p=0.001$).

Sistolik ve diyastolik kan basıncı, total ve LDL-kolesterol düzeyleri, HOMA-IR değeri, sağ ve sol karotis İMK her iki grupta benzerdi ($p>0.05$).

Kadınlarda; BKİ, sistolik kan basıncı ($p<0.001$, $r=0.349$), diastolik kan basıncı ($p<0.001$, $r=0.354$), bel çevresi ($p<0.001$, $r=0.753$), trigliserid ($p=0.001$, $r=0.284$) ve HOMA-IR ($p=0.001$, $r=0.291$) ile pozitif korelasyon göstermekteydi. Hs-CRP için, fibrinojen ($p<0.001$, $r=0.362$) dışında hiçbir parametre ile anlamlı korelasyon saptanmadı. AUC-glukoz ile AUC-insülin arasında kuvvetli pozitif korelasyon saptandı ($p<0.001$, $r=0.369$).

Erkeklerde; BKİ ile sistolik kan basıncı ($p<0.001$, $r=0.437$), diastolik kan basıncı ($p=0.014$, $r=0.297$), bel çevresi ($p<0.001$, $r=0.868$), trigliserid ($p<0.001$, $r=0.434$) ve HOMA-IR ($p<0.001$, $r=0.493$), AUC-insülin ($p=0.005$, $r=0.345$) arasında, AUC-glukoz ile AUC-insülin ($p=0.002$, $r=0.369$) arasında korelasyon saptandı. hs-CRP ile fibrinojen ($p<0.001$, $r=0.500$) dışında diğer parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı.

Tablo 2. Grupların antropometrik, metabolik ve karotis İMK değerleri

	AÖ(+)	AÖ(-)	p
BKI (kg/m ²) *			0.020 <0.001*
Kadın	22.2 ± 2.3	21.2 ± 2.0	
Erkek	23.4 ± 2.4	23.1 ± 2.1	
Bel çevresi (cm) *			NS <0.001*
Kadın	74.0 ± 7.0	71.8 ± 6.4	
Erkek	85.2 ± 7.3	85.0 ± 7.4	
Sistolik kan basıncı (mmHg)	108 ± 11	112 ± 12	NS
Diastolik kan basıncı (mmHg)	71 ± 7	73 ± 8	NS
Total kolesterol (mg/dl)	167.2 ± 29.4	165.0 ± 25.5	NS
Trigliserid (mg/dl) * §	78,7 ± 29,5	80,6 ± 33,9	NS P<0.001* P=0.038 §
Kadın			
Sigara(-)	71.7 ± 24.7	64.7 ± 21.9	
Sigara(+)	77.0 ± 32.8	95.8 ± 37.8	
Erkek			
Sigara(-)	90.5 ± 31.2	96.1 ± 42.2	
Sigara(+)	117.3 ± 33.1	99.3 ± 28.4	
HDL-kolesterol (mg/dl)*			NS <0.001*
Kadın	62.0 ± 12.8	65.3 ± 11.1	
Erkek	50.2 ± 9.0	49.4 ± 9.7	
LDL-kolesterol (mg/dl)	92.2 ± 26.0	90.8 ± 24.2	NS
Fibrinojen (mg/dl) *			NS P=0.031*
Kadın	362.3 ± 81.1	344.6 ± 74.1	
Erkek	317.6 ± 77.6	296.9 ± 64.1	
hs-CRP (mg/dl) †			
Kadın	0.098 (0.019-1.593)	0.055 (0.015-0.610)	<0.05 ¶
Erkek	0.097 (0.029-0.614)	0.071 (0.021-0.493)	>0.05 ¶
Açlık glukoz (mg/dl) *			NS <0.001
Kadın	76.4 ± 9.1	77.0 ± 7.9	
Erkek	81.2 ± 9.8	74.7 ± 9.1	
HOMA-IR	1.33 ± 0.78	1.17 ± 0.74	NS
AUC-glukoz *			NS P<0.05
Kadın	185.4 ± 33.4	183.8 ± 38.6	
Erkek	231.2 ± 44.2	198.1 ± 35.8	
AUC-insülin *			NS P:0.049 *
Kadın	76.7 ± 34.5	70.3 ± 33.6	
Erkek	98.3 ± 51.0	86.7 ± 53.6	
Adiponektin (microg/ml) * §			NS 0.001 * 0.002 §
Kadın			
Sigara (-)	13.86 ± 7,74	14,28 ± 5,51	
Sigara (+)	11.54 ± 5,30	7,66 ± 2,51	
Erkek			
Sigara (-)	10.49 ± 3,31	10,44 ± 4,25	
Sigara (+)	7,58 ± 3,88	6,29 ± 2,73	
Sağ Karotis İMK (mm)	0.735 ± 0.094	0.720 ± 0.080	NS
Sol Karotis İMK (mm)	0.741 ± 0.099	0.728 ± 0.088	NS

NS(Nonsignificant), p>0.05

p<0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

* Cinsiyet etkisi gözlenen parametre

§ Sigara etkisi gözlenen parametre

¶ Mann-Whitney U testi uygulandı

† Sırası ile median (Minimum-maksimum) değerler verimiştir.

AÖ, Aile öyküsü

Her iki grubun genotip dağılımları Hardy-Weinberg eşitliği kuralına uymaktaydı (AÖ olanlarda $\chi^2=0.2463$, $p=0.62$, AÖ olmayanlarda $\chi^2=0.6353$, $p=0.43$). Genotip dağılımları açısından iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Her iki grupta cinsiyetlere göre genotip dağılımı da benzer olarak bulundu ($p>0.05$). Her iki grupta Pro12Ala polimorfizm sıklığı benzerdi (Tablo 3). AÖ olan grupta Pro12Ala polimorfizm sıklığı %14.6, AÖ olmayan grupta %9.9 olarak saptandı. Her iki grupta cinsiyete göre genotip dağılımları arasında da istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Allel sıklıkları; AÖ olan grupta C allel; %92.7, G allel; %7.3, AÖ olmayan grupta C allel; %95.1, G allel; % 4.9 oranlarındaydı. İki grubun toplamında G allel sıklığı %6.3 olarak hesaplandı.

Tablo 3. Her iki grup arasında genotip dağılımlarının kıyaslanmasında χ^2 test uygulandı.

Genotip	AÖ (+)		AÖ(-)	
	CC (Pro12Pro)	CG (Pro12Ala)	CC (Pro12Pro)	CG (Pro12Ala)
Kadın	67 (%87.0)	10 (%13.0)	43 (%89.6)	5 (%10.4)
Erkek	21 (%80.8)	5 (%19.2)	39 (%90.7)	4 (%9.3)
Toplam	88 (%85.4)	15 (%14.6)	82 (%90.1)	9 (%9.9)

AÖ, Aile öyküsü

Genotip dağılımı ile antropometrik, biyokimyasal parametreler ve karotis İMK arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 4).

Tablo 4. Genotip dağılımı ile antropometrik, biyokimyasal parametreler ve karotis İMK

T test	CC	CG	p
BKI (kg/m ²)	22.2 ± 2.3	23.0 ± 2.4	NS
Bel çevresi (cm) Kadın Erkek	73.0 ± 6.9 85.1 ± 7.2	73.6 ± 6.3 83.9 ± 7.6	NS
Sistolik kan basıncı (mmHg)	109.8 ± 12.2	114.0 ± 11.3	NS
Diastolik kan basıncı (mmHg)	72.3 ± 8.0	73.8 ± 8.1	NS
Total Kolesterol (mg/dl)	166.7 ± 28.5	162.9 ± 22.1	NS
Trigliserid (mg/dl)	79.8 ± 32.0	77.1 ± 29.6	NS
HDL-kolesterol (mg/dl) Kadın Erkek	63.1 ± 12.1 49.9 ± 9.4	63.5 ± 13.8 49.3 ± 10.8	NS
LDL-kolesterol (mg/dl)	91.9 ± 25.2	89.4 ± 26.0	NS
Fibrinojen (mg/dl)	339.3 ± 78.7	339.1 ± 87.6	NS
hs-CRP (mg/dl) †	0.078 (0.015-1.593)	0.081(0.018-0.239)	NS¶
Adiponektin (microg/ml)	11.78 ± 6,00	13.34 ± 7.66	NS
HOMA-IR	1.23 ± 0.76	1.31 ± 0.81	NS
AUC-glukoz	193.7 ± 38.0	200.7 ± 50.5	NS
AUC-insülin	78.7 ± 40.9	94.9 ± 59.9	NS
Sağ İMK (mm)	0.730 ± 0.091	0.716 ± 0.060	NS
Sol İMK (mm)	0.736 ± 0.098	0.732 ± 0.067	NS

NS(Nonsignificant), p>0.05

¶ Mann-Whitney U testi uygulandı

† Sırası ile median (Minimum-maksimum) değerler vermiştir

AÖ, Aile öyküsü

5. TARTIŞMA

T2DM gelişimi için İD ve bozulmuş insülin sekresyonunun her ikisinin birlikteliği gerekmektedir. T2DM açısından yüksek risk taşıyan, normal glukoz tolerans(NGT) veya bozulmuş glukoz toleransına(İGT) sahip kişilerde insülin etkisinin ve insülin sekresyonunun ölçümü diyabet açısından belirleyicidir.

Tip 2 diyabetiklerin, genç erişkin çağda normoglisemik, normotansif, non-obez çocuklarında, İD ve metabolik sendromun farklı bileşenlerinin bulunabildiği öglisemik hiperinsülinemik klemp tekniğinin kullanıldığı çalışmalarda gösterilmiştir(84,85,86). Ebeveynleri tip 2 diyabetik olmayanlar ile kıyaslandığında, ebeveynleri diyabetik olan kişilerin çocukluklarından başlayarak BKİ ve subskapüler deri kalınlığı ile ölçülen jeneralize ve trunkal vücut yağ kitlesinde artış ve ardından adölesan çağlarına doğru İD parametreleri olan insülin, glukoz ve HOMA-IR değerlerinde yükselme gösterdikleri ve erişkin dönemlerinde daha yüksek LDL-kolesterol, trigliserid, daha düşük HDL-kolesterol düzeylerine sahip oldukları bildirilmiştir(87). Çalışmamızda obez ve diyabetik olmayan, fakat T2DM açısından AÖ bulunanların BKİ' nin kontrollere göre daha yüksek bulunması ve metabolik sendrom bileşenleri (bel çevresi, kan basıncı, trigliserid) ve HOMA-IR ile korelasyon göstermesi, BKİ' nin genetik olarak proglamlandığını ve ileride diyabet gelişimi açısından bir risk faktörü olabileceğini destekler niteliktedir. Fakat, AÖ bulunanların, AÖ bulunmayanlara göre daha fazla insüline dirençli olduklarını gösterecek şekilde HOMA-IR ve AUC-insülin değerlerinde yükseklik saptayamadık. Oysa ki; T2DM aile öyküsü olan non-obez kişilerde insülin duyarlılığının azaldığı bilinmektedir. Bu çalışmaların pek çoğunda insülin duyarlılığının değerlendirilmesinde en kesin yöntem, altın standart olan hiperinsülinemik klemp tekniği(88) kullanılmıştır. Klemp yönteminin uygulaması zahmetli ve zaman alıcı olması nedeni olgu sayısının fazla olduğu çalışmalarda kullanılması uygun değildir. Çalışmamızda bu nedenle İD' nin değerlendirilmesinde daha basit bir yöntem olan HOMA-İR formülü kullanılmıştır. Fakat bu yöntemin çeşitli kısıtlayıcı yönleri bulunmaktadır.

Özellikle de diyabetik olmayan kişilerde İD' nin değerlendirilmesinde duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür(89). Örneğin; Tip 2 diyabetiklerin genç erişkin yaşlardaki, normal kilolu, non-diyabetik çocuklarında açlık ve OGTT sonrası glukoz ve insülin değerleri kontrol grubundan farklı bulunmazken, klemp yöntemi ile AÖ olan grupta insülin duyarlılık indeksinin anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır(90).

Önceleri İD, T2DM patogenezinde en önemli genetik defekt olarak düşünülürken, T2DM' e genetik olarak yatkın normal glukoz toleransı (NGT)' na sahip kişiler, gestasyonel diyabet öyküsü olan NGT' li kadınlar ve ileriki yıllarda IGT ve T2DM geliştiren NGT' li olgulardan elde edilen verilerin incelenmesi sonucu zamanla bu görüş değişmiştir. Bozulmuş insülin sekresyonu ile ilişkili genetik bozukluk T2DM patogenezinde daha temel bir bileşen olduğu düşünülmüştür(91). Hiperglisemik klemp tekniği glukozun ilk ve ikinci faz insülin sekresyon yanıtının ölçülmesinde en güvenilir yöntemdir. İntravenöz glukoz toleran testi(IVGTT) ile de akut insülin yanıtı değerlendirilebilmektedir. OGTT temelde glukoz toleransının değerlendirilmesi için oluşturulmuştur. Ayrıca glukoz alımından sonra belirli zamanlarda glukoz ile birlikte insülin (c-peptid) düzeylerinin ölçümü insülin duyarlılığı ve insülin sekresyonu hakkında bir tahminde bulunmayı sağlamaktadır. Fakat hiçbir zaman bu iki parametrenin kesin olarak ölçümünü sağlamamaktadır. β -hücre fonksiyonlarının ölçümünde kesinliğini kısıtlayan bazı içsel faktörler bulunmaktadır. Birincisi; enterik hormonlar ve nöral uyarılar insülin sekresyonunu etkiler. İkincisi; mide motilitesi ve mide boşalım zamanı, glukozun kandaki artış hızı ve böylece insülin yanıt hızını değiştirir. Üçüncüsü; insülin duyarlılığına göre, kandan glukozun alınış hızının değişmesidir. Bu üç faktör kişiden kişiye farklılık gösterir. Bu nedenle OGTT sonrası glukoz düzeyi sürekli bir değişkenlik içindedir. Bu nedenlerle β -hücre fonksiyonunun OGTT ile değerlendirilmesi büyük toplum temelli, genetik epidemiyolojik çalışmalarda önerilmektedir(91).

Tip 2 diyabetiklerin non-diyabetik, birinci derece yakınlarında dolaşımdaki adiponektin düzeylerinin araştırıldığı çalışmalarda değişik sonuçlar bildirilmiştir.

Klemp yöntemi kullanılarak, AÖ bulunanların, AÖ bulunmayanlardan daha fazla insülin direncine sahip oldukları ve subkutan yağ dokularında adiponektin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiş olmakla birlikte serum adiponektin düzeylerinde farklılık saptanmamıştır(92). Farklı bir çalışmada tip 2 diyabetiklerin insülin dirençli, non-obez birinci derece yakınlarında adiponektin düzeylerinin kontrol grubundan belirgin şekilde düşük olduğu gözlenmiştir(93). İnsülin duyarlılığının klemp yöntemi ile değerlendirildiği benzer bir çalışmada AÖ olanların adiponektin düzeyleri AÖ bulunmayanlardan daha düşük bulunmuştur(94). Civitarese ve arkadaşları(95), tarafından, plazma adiponektin yanı sıra iskelet kasında her iki adiponektin reseptörünün (AdipoR1 ve AdipoR2) gen ekspresyon düzeyinin de, non-diyabetik, AÖ bulunanlarda daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ekspresyon düzeyi ile insülin duyarlılığı korele bulunmuş ve AÖ bulunanlarda ekspresyon düzeyindeki anormalliğin T2DM patogeneze katkıda bulunabileceği vurgulanmıştır. Tip 2 diyabetiklerin genç erişkin çağıdaki, normal kilolu, non-diyabetik çocuklarında İD patogenezinde adiponektinin rolü ve TNF- α ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmada, AÖ olan grupta plazma TNF- α ve solubl TNF reseptör 1(sTNFR1) düzeylerinde farklılık bulunmazken adiponektin düzeylerinde anlamlı düşüklük ve sTNFR2 düzeylerinde yükseklik bildirilmiştir(90). Bu kanıtların tersine, tip 2 diyabetiklerin non-diyabetik birinci derece akrabalarında insülin duyarlılığının daha düşük olduğu fakat adiponektin düzeylerinin farklı bulunmadığı çalışmalar da literatürde yer almaktadır. Tip 2 diyabetiklerin nonobez, non-diyabetik birinci derece yakınlarında İD, iflamasyon ve adiposite ilişkisinin incelendiği çalışmada, araştırma grubunun insülin duyarlılığı daha düşük olmakla birlikte kontrol grubu ile benzer adiponektin düzeyleri saptanmıştır(96). Farklı bir çalışmada, kontroller ile kıyaslandığında, AÖ bulunanlarda BkI ve bel çevresi daha fazla olmasına rağmen serum adiponektin, lipid parametreleri ve HOMA-IR değeri farklı bulunmamıştır(97). Nonobez, non-diyabetik kişilerde, mitokondrial aktivite ile AÖ arasındaki ilişkinin araştırıldığı diğer bir çalışmada, plazma TNF- α , IL-6, rezistin yanı sıra adiponektin düzeylerinde de her iki grup arasında farklılık saptanmamıştır(98). Farklı araştırmacıların bildirmiş olduğu sonuçlardaki bu tezatlığı açıklamak zor görünmektedir(90). Çalışma gruplarının

özellikleri ya da genetik sebepler söz konusu olabilir. Literatürdeki negatif sonuçlarla uyumlu olarak AÖ olan grupta serum adiponektin düzeylerinde kontrollerden farklılık saptamadık. Fakat kadınlarda ve sigara içmeyenlerde, içenlere göre anlamlı olarak daha yüksekti.

Sigara kullanımı kardiyovasküler hastalık(KVH) için en önemli risk faktörlerinden biridir(99) ve İD ile ilişkili olduğu bilinmektedir(100). Ayrıca sigara alışkanlığının düşük adiponektin düzeyleri ile ilişkili olduğunu destekleyen kanıtlar bulunmaktadır(101,102). Sigaranın içerisindeki nikotinin, adiponektinin yağ dokusundaki ekspresyonunu direkt olarak azalttığı düşünülmektedir. KVH' da dolaşımdaki adiponektin düzeylerinin düşük bulunmasından dolayı adiponektinin ateroskleroz oluşumundaki mekanizmalarda yer alabileceği vurgulanmaktadır. Sigara kesilmesi ile adiponektin düzeylerinde artış olduğu bildirilmektedir(103,104).

Sigaranın lipid profili üzerine de etkileri bulunmaktadır. Serum lipid ve lipoprotein düzeyleriyle ilişkisinin incelemek için 54 çalışmanın değerlendirilmesi sonucunda, sigara içmeyenler ile kıyaslandığında sigara içenlerde serum kolesterolünün %3, trigliseridinin %9.1, VLDL' sinin %10.4, LDL-kolesterolünün %1.7 daha yüksek ve HDL-kolesterolünün %5.7 daha düşük olduğu bildirilmiştir(105). Sigara içmeyen, pasif ve aktif olarak sigara içen kişilerde sigaranın besin, antioksidan ve risk faktörlerine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada gruplar arasında antropometrik, diastolik kan basıncı, kolesterol ve LDL-kolesterol ölçümlerinde farklılık saptanmamakla birlikte sigara içenlerde TG ölçümleri içmeyenlere göre daha yüksek bulunmuştur(106).

Sigaranın viseral yağ dokusunun bir göstergesi olan bel-kalça oranında artışa neden olduğu bunu da çeşitli mekanizmalarla yaptığı düşünülmektedir. Sigara kullanımı ile sempatik uyarı sonucu kortizol düzeylerinin artması viseral yağ dokusunu etkilemektedir. Yine testosteron ve östrojen üzerine olan etkiler ile bel-kalça oranında artış meydana gelmektedir. Sigaranın İD' ne neden olmasından sorumlu mekanizmalarda adiponektinin düşüklüğünün rolü olabilir.

İD direnci nedeni ile yağ dokusunda lipoliz artışı serum trigliserid artışı ile sonuçlanabilir. Sigara içenlerde adiponektin düzeylerini daha düşük, trigliserid düzeylerini daha yüksek saptamamız, sigaranın metabolik parametrelere etkilerinin adiponektin üzerinden de olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, konuyla ilgili olarak yapılabilecek çalışmaların planlanmasına ışık tutması açısından önemli olabilir.

Çalışmamızda glukoz, insülin, trigliserid ve adiponektin düzeylerinde cinsiyetle ilişkili olabilecek farklılıklar saptanmıştır. Metabolik parametrelerin kadın ve erkeklerde farklılık gösterebildiği literatürde yer almaktadır. Metabolik değişkenlikte cinsiyete göre farklılıkların olmasında yağ dokusunun önemli rolü olabilir(107). Sağlıklı genç kadınlar erkeklerle kıyaslandığında insülinle uyarılmış glukoz oksidasyonu ve insülinin nonesterifiye serbest yağ asid(NEFA)'lerini suprese etme kapasitesi daha yüksek bulunmuştur. Adiponektin düzeyleri kadınlarda erkeklerden daha yüksektir(107,108). Cinsiyete bağlı farklılık, erkeklerde testosteronun yağ dokusunda adiponektin sekresyonunu direkt olarak etkilemesine bağlanmıştır. Fakat serum testosteron ve adiponektin düzeylerinin obez erkeklerde normal kilolu olanlara göre genellikle daha düşük olması, adiponektin düzeylerindeki farklılığa sadece seks steroidlerinin etkili olmadığını düşündürmektedir. Normal kilolu ve obez kadın ve erkeklerde cinsiyet, vücut kompozisyonunun ve NEFA'lerinin serum adiponektin düzeylerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, total serum adiponektin düzeyleri sadece erkeklerde BKI ile ilişkili bulunmuştur. Adiponektin, HOMA-IR ile kadın ve erkeklerde negatif korele iken, NEFA'leri ile negatif korelasyonu erkeklerde gösterilmiştir. Obez kadın ve erkekler arasında HOMA-IR benzer iken NEFA'lerinin yüksekliği obez erkeklerde saptanmış, obez genç erkeklerde NEFA'lerinin adiponektin düzeylerini insülin duyarlılığı üzerine olan etkilerinden bağımsız olarak azaltabileceği belirtilmiştir.

Açlık ve glukoz yükleme sonrası glukoz değerlerini erkeklerde kadınlardan daha yüksek olarak saptadık ve AÖ olanlarda açlık glukoz ve AUC-glukoz daha yüksekti. Bu bulguya tezat olarak çeşitli epidemiyolojik

çalışmalarda kadınlarda OGTT' den sonra 2. saat glukoz değerinin erkeklerden daha yüksek olduğunu ve bu farkın da iskelet kas kitlesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Kas kitlesinin cinsiyete bağlı farklılığa katkısının olup olmadığı non-diyabetik kişilerde araştırılmıştır. Yükleme sonrası kadınlarda 2. saat glukoz yksekliliğinin cinsiyete spesifik bulunmamış, fakat kısmen düşük kas kitlesi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (109). Açlık glukoz ve AUC-glukoz değerleri zerine A' nn etkisi saptanmazken erkeklerde A olanlarda, glukoz değerleri kontrol grubundan daha yüksekti. Bu sonuç, T2DM için genetik risk taşıyan erkek bireylerin glukoz metabolizma bozukluğuna daha yatkın olabileceklerini dşndrebilir.

PPAR-γ gen Pro12Ala polimorfizminin yağ metabolizması, insülin duyarlılığı ve vücut ağırlılığının düzenlenmesindeki rolü oldukça karmaşık ve birçok faktörün etkisi altında gözükmektedir. Tip 2 diyabetiklerin obez olmayan birinci derece yakınlarıyla yapılmış çeşitli çalışmalarda Pro12Ala polimorfizminin insülin duyarlılığı ve glukoz hemostazına olan etkilerinin mekanizmaları araştırılmıştır. ek toplumu'nda T2DM aile öyküsü bulunan non-obez, non-diyabetik kişilerde A bulunmayan kontroller ile kıyaslandığında yaş ve BKİ' ne göre düzeltme yapıldığında insülin, glukoz, lipid parametreleri açısından fark bulunmamış, her iki grupta polimorfizm sıklıkları benzer olarak bildirilmiş, 12Ala genotipi serbest yağ asidi düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir. Sonuçlarda Ala allel sıklığı %15.3 oranında verilmiştir(110).

Pro12Ala polimorfizmi etkileri açısından, gen-evre etkileşiminin önemli olduğu genetik bir varyanttır. Örneğin; Pro allelin etkisi, fiziksel aktivitesi düşük olanlarda daha fazla görünmektedir(111). Ala allel taşıyanlarda, fiziksel aktivite düzeyi poliansatüre/satüre yağ asidi oranı ile açlık insülin düzeyleri arasındaki ilişkiyi etkilemektedir(112). Polimorfizmin etkilerinde çevrenin yanı sıra ırksal ve etnik farklılıkların da rolü bulunmaktadır (55,57).

Tnjes ve arkadaşları(113), hipergliseminin kendisi, İD ve insülin sekresyonunu etkileyebildiği için Pro12Ala ile T2DM ilişkisinin mekanizmalarını

daha iyi ortaya koyabilmek için non-diyabetik (NGT ve IGT) kişilerin, 57 uygun çalışmadan elde edilen verilerini bir metaanalizde incelemişlerdir. Beyaz ırk ve obez kişilerin bulunduğu seçilmiş gruplarda Ala allelinin BKİ üzerine etkisini gözlemlemişlerdir. Non-diyabetik populasyonda Pro12Ala polimorfizminin diyabetle ilişkili özelliklere (BKİ, glukoz, insülin, HOMA-IR) anlamlı bir etkisini saptayamamışlardır. Bu bilgi, Pro12Ala polimorfizminin etkileriyle ilgili bizim çalışmamızdaki sonuçlarla örtüşmektedir.

Çalışmamızda Ala genotip sıklığı açısından AÖ olan ve olmayanlarda farklılık saptanmadı. Literatürde Ala allel sıklığı beyaz ırk için %12 (55,57), iken çalışmamızda bu oran daha düşük bulundu. Çin’ de farklı etnik gruplar olan Uygur, Kazak ve Han’ larda Pro12Ala polimorfizminin T2DM’ a yatkınlıkta etkili olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmış çalışmada her bir etnik grupta diyabetik ve non-diyabetikler arasında Pro12Ala genotip dağılımı açısından fark bulunmamıştır(114). Fakat non-diyabetik olanlarda Ala allel sıklığında etnik gruplar arasında farklılık saptanmıştır. Uygur, Kazak ve Hanlar’ da Ala allel sıklığı sırası ile; %11,%9 ve %5 oranlarında bildirilmiştir. Her bir etnik topluluk için, genotip dağılımı ile açlık glukoz, insülin, HOMA-IR arasında her iki grupta anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Literatürde, Toplumumuzda Pro12Ala polimorfizm ve Ala allel sıklığı ve etkilerinin incelendiği büyük çaplı araştırma sonuçları bulunmamaktadır. Çeşitli hasta gruplarıyla yapılmış çalışmalarda farklı veriler sunulmuştur.

Pro12Ala polimorfizminin gestasyonel diabetes mellitus(GDM)’ lu olgularda kilo alımı ile ilişkisinin gösterildiği çalışmada non-diyabetik gebelerle kıyaslandığında GDM’ lu olgularda polimorfizm sıklığı benzer (GDM; %19.4, non-diyabetik gebe; %16) bulunmuş, polimorfizm ile glukoz metabolizması arasında ilişki gözlenmemiştir. Olguların hiçbirinde Ala12Ala homozigot mutasyon saptanmamıştır(115). Farklı bir çalışmada, Türk polikistik over sendromu(PCOS)’ lu hastaların birinci derece yakınlarının, yaş ve BKİ’ i benzer kontrollere göre daha fazla glukoz metabolizma bozukluğuna sahip oldukları, Ala allel sıklığının daha düşük, açlık insülin, HOMA-IR ve AUC-insülin

değerlerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ala allel sıklığı araştırma grubunda %10.8 kontrol grubunda ise %22.5 oranında saptanmıştır(116). Atuğ ve arkadaşları tarafından, inflamatuvar barsak hastalığında (ülseratif kolit, chron hastalığı) ve kontrol grubunda benzer olmak üzere polimorfizm sıklıklarını sırası ile %15.9, %15.5 ve %13 olarak bildirilmiştir. Bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak bu çalışmada da Ala12Ala genotipi saptanmamıştır(117).

T2DM ile ateroskleroz ve İMK arasındaki ilişki bilinmektedir. Tip 2 diyabetiklerin normoglisemik birinci derece yakınlarında ise karotis İMK' nın AÖ olmayanlara göre daha fazla olduğunu gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır(118,119). Fakat bu çalışmalardaki olgular BKİ ve yaş açısından seçilmiş gruplardan oluşmamıştır. Olgularımızda AÖ' nün karotis İMK' na herhangi bir etkisini saptamadık. Karotis İMK, aterosklerozun erken bir göstergesi olmakla birlikte, henüz aşikar metabolik bozukluğu olmayan, non-obez fakat riskli olgularda ateroskleroz gelişimi açısından karotis İMK ölçümünden daha duyarlı yöntemlere gereksinim olabilir.

hs-CRP düşük dereceli sistemik kronik inflamasyonun duyarlı bir göstergesidir ve İD, abdominal obezite ve dislipidemi gibi metabolik sendrom bileşenleri ile yakından ilişkilidir(120). Fakat özellikle İD gelişimi ile inflamasyon arasındaki bu ilişki yeterince açıklığa kavuşmamıştır. İD ve inflamasyon ilişkisinde kabul gören görüş CRP yüksekliğinin bir sebepten çok sonuç olduğudur. Tip 2 diyabetiklerin, normoglisemik, normotansif, erişkin çağıdaki çocuklarında vasküler ve metabolik bozukluklara proinflamatuvar durumun eşlik ettiği ve bu durumun da diyabet ve vasküler hastalık gelişimine katkıda bulunabileceği vurgulanmıştır(121). Non-obez, normoglisemik, birinci derece aile bireylerinde AÖ olmayanlara göre insülin duyarlılığı beklenildiği üzere daha az olmakla birlikte CRP düzeyleri farklı bulunmamış, tüm olgular değerlendirildiğinde CRP düzeyleri adiposite ile ilişkilendirilmiştir(122).

hs-CRP düzeyleri cinsiyete bağlı olarak farklılık gösterir. Aterotrombotik hastalık riski bulunan, BKİ ve yaşları birbirine benzer sağlıklı kişilerde hs-CRP

düzeyleri kadınlarda erkeklerden daha yüksektir(123). Toplum temelli büyük bir çalışmada hs-CRP düzeyleri ve insülin duyarlılığı üzerine cinsiyet etkisi gözlenmiş, fakat hs-CRP ile insülin duyarlılığı arasında ilişki saptanamamıştır(124).

Çalışmamızda, diğer çalışmalardaki cinsiyet farkına ilişkin bulgularla uyumlu olarak hs-crp düzeyleri kadınlarda, erkeklerden anlamlı olarak daha yüksekti. hs-CRP düzeylerinin AÖ bulunanlarda daha yüksek olmakla birlikte sadece kadınlarda istatistiksel anlamlılık göstermesi ve fibrinojen dışında başka parametrelerle ilişkilendirilememesi, hs-CRP düzeylerine AÖ' nün etkisinin olabileceğini, fakat nedenselliği ortaya koymada yeterli olmadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızın kısıtlayıcı yönleri bulunmaktadır. Birincisi; genetik polimorfizm araştırması olmasından dolayı olgu sayısının kısmen fazla olması nedeni ile glukoz metabolizması, insülin duyarlılığı, insülin sekresyonunun değerlendirilmesinde en duyarlı yöntem olan klemp testi uygulanamaması, ikincisi; metabolik parametreler ve inflamasyon göstergelerine etkili olabilen fiziksel aktivite(125) açısından olguların değerlendirilememesi ve üçüncüsü ise; adipositenin incelenememiş olmasıdır.

Sonuç olarak, Türk Toplumunda tip 2 diyabetiklerin diyabetik ve obez olmayan, birinci derece aile bireylerinde, PPAR- γ 2 gen Pro12Ala polimorfizm sıklığı aile öyküsü olmayanlardan farklı bulunmamıştır. Antropometrik, metabolik, inflamatuvar ve diğer parametreler üzerine polimorfizm etkisi saptanamamış olmakla birlikte cinsiyet ve aile öyküsü kaynaklı farklılıklar gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations 2009. Diabetes Care. 2005; 32(suppl-1)
2. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, Connolly V, King H. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. Diabetes Care. 2005 Sep; 28(9):2130-5.
3. Economic consequences of diabetes mellitus in the United States in 1997. American Diabetes Association. Diabetes Care. 1998; 21:296-309.
4. Caro JJ, Ward AJ, O'Brien JA. Lifetime costs of complications resulting from type 2 diabetes in the U.S. Diabetes Care. 2002 ;25(3):476-81.
5. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. Diabetes Care. 2004; 27(5): 1047-1053.
6. Satman I, Yilmaz T, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S, Bastar I, Tutuncu Y, Sargin M, Dinccag N, Karsidag K, Kalaca S, Ozcan C, King H. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the Turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). Diabetes Care. 2002;25(9):1551-6.
7. Doria A, Patti ME, Kahn CR. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. Cell Metab. 2008;8(3):186-200
8. Kabalak T, Çetinkalp Ş. Tip 2 diabetes mellitus. Editör: Ş.imamoğlu. Yardımcı editör: C.Özyardımcı Ersoy. Diabetes Mellitus 2009. Gözden geçirilmiş ve genişletilmiş 2. baskı. Deomed, İstanbul, 2009; S:53-72
9. 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;340(8825):925-9
10. Goldfine AB, Bouche C, Parker RA, Kim C, Kerivan A, Soeldner JS, Martin BC, Warram JH, Kahn CR. Insulin resistance is a poor predictor of type 2 diabetes in individuals with no family history of disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(5):2724-9

11. Lyssenko, V., Almgren, P., Anevski, D., Perfekt, R., Lahti, K., Nissen, M., Isomaa, B., Forsen, B., Homstrom, N., Saloranta, C., et al. (2005). Predictors of and longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion preceding onset of type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 166–174.
12. Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT, Lakka TA. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol.* 2002;156(11):1070-7
13. Lorenzo C, Okoloise M, Williams K, Stern MP, Haffner SM; San Antonio Heart Study. The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio heart study. *Diabetes Care.* 2003; 26(11):3153-9
14. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414:799-806
15. Kahn CR. Knockout mice challenge our concepts of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2003;4(3):169-82
16. Virally M, Blicke JF, Halimi S, Simon D, Guillausseau PJ. Tip 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes Metab.* 2007; 33(4):231-44
17. Çorakçı A, Azal Ö, Beyhan Z. Dabetes mellitus' ta oral ajan tedavisi. Editör: Ş.ımamoğlu. Yardımcı editör: C.Özyardımcı Ersoy. *Diabetes Mellitus 2009.* Gözden geçirilmiş ve genişletilmiş 2. baskı. Deomed, İstanbul, 2009; 138-175
18. Pimenta W, Korytkowski M, Mitrakou A, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, Evron W, et al. Pancreatic beta-cell dysfunction as the primary genetic lesion of NIDDM. Evidence from studies in normal glucose-tolerant individuals with a first-degree NIDDM relative. *JAMA* 1995;273:1855–61.
19. Klip A, Paquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their matabolic regulation. *Diabetes Care.* 1990;13: 228-243
20. Zhao YF, Feng DD, Chen C. Contribution of adipocyte-derived factors to beta-cell dysfunction in diabetes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(5-6):804-819.

21. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271(5249):665-8.
22. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7(8):941-6.
23. Tilg H, Wolf AM. Adiponectin: a key fat-derived molecule regulating inflammation. *Expert Opin Ther Targets*. 2005;9(2):245-51.
24. Salmenniemi U, Zacharova J, Ruotsalainen E, Vauhkonen I, Pihlajamaki J, Kainulainen S, Punnonen K, Laakso M. Association of adiponectin level and variants in the adiponectin gene with glucose metabolism, energy expenditure, and cytokines in offspring of type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(7):4216-23.
25. Sull JW, Kim HJ, Yun JE, et al. Serum adiponectin is associated with family history of diabetes independently of obesity and insulin resistance in healthy Korean men and women. *Eur J Endocrinol*. 2009;160(1):39-43
26. Malecki MT. Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;68 Suppl1:S10-21
27. Bhatia V; IAP National Task Force for Childhood Prevention of Adult Diseases. IAP National Task Force for Childhood Prevention of Adult Diseases: insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus in childhood. *Indian Pediatr*. 2004;41(5):443-57
28. 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;113(12):909-15

29. Fujimoto WY, Bergstrom RW, Boyko EJ, Kinyoun JL, Leonetti DL, Newell-Morris LL, Robinson LR, Shuman WP, Stolov WC, Tsunehara CH, et al. Diabetes and diabetes risk factors in second- and third-generation Japanese Americans in Seattle, Washington. *Diabetes Res Clin Pract.* 1994;24 Suppl:S43-52
30. Grant RW, Moore AF, Florez JC. Genetic architecture of type 2 diabetes: recent progress and clinical implications. *Diabetes Care.* 2009;32(6):1107-14
31. Kang ES, Yun YS, Park SW, et al. Limitation of the validity of the homeostasis model assessment as an index of insulin resistance in Korea. *Metabolism,* 2005;54(2):206-11
32. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes care,* 2004; 27(6):1487-95
33. Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res.* 2001;56:239-63
34. Kiec-Wilk B, Dembinska-Kiec A, Olszanecka A, Bodzioch M, Kawecka-Jaszcz K. The selected pathophysiological aspects of PPARs activation. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56(2):149-62
35. 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;5(2):99-109. Review
36. Guan Y. Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15(11):2801-15.
37. Gurnell M. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and the regulation of adipocyte function: lessons from human genetic studies. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2005; 19(4):501-523.
38. Ferre P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes.* 2004;53,Suppl 1:S43-50

39. Knouff C, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. *Endocr Rev.* 2004;25(6):899-918. Review
40. Walczak R, Tontonoz P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism. *J Lipid Res.* 2002;43(2):177-86.
41. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994 ;8(10):1224-34
42. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994;79(7):1147-56
43. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell.* 1999; 4:585-95
44. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 1999 ;4:611-7.
45. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell.* 1999;4:597-609.
46. Hallakou S, Doare L, Foufelle F, et al. Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. *Diabetes.* 1997;46(9):1393-9.
47. Adams M, Montague CT, Prins JB, et al. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest.* 1997;100(12):3149-53.
48. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, et al. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest.* 2000;106(10):1221-8
49. Fasaj L, Auboeuf D, Raspe E, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18779-89

50. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000; 106: 523–531
51. Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(1):52-7
52. Sharma AM, Staels B. Review: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Adipose Tissue—Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(2):386-95
53. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem.* 1997;272(32):20230-5.
54. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet.* 1998;20(3):284-7.
55. Stumvoll M, Häring H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes.* 2002 ;51(8):2341-7. Review
56. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, ET AL. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 241:270–274, 1997
57. Hara K, Okada T, Tobe K, et al. The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;271(1):212-6.
58. Ghossaini M, Meyre D, Lobbens S, Charpentier G, Clement K, Charles MA, Tauber M, Weill J, Froguel P. Implication of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma 2 gene in type 2 diabetes and obesity in the French population. *BMC Med Genet.* 2005;6:11.

59. Hara K, Okada T, Tobe K, Yasuda K, Mori Y, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Kimura S, Ito C, Kadowaki T. The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;271(1):212-6.
60. Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Hansen L, Carstensen B, Borch-Johnsen K, Drivsholm T, Berglund L, Hansen T, Lithell H, Pedersen O. Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant caucasians. *Diabetologia.* 2001;44(9):1170-6.
61. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2000; 26(1):76-80.
62. Moon MK, Cho YM, Jung HS, Park YJ, Yoon KH, Sung YA, Park BL, Lee HK, Park KS, Shin HD. Genetic polymorphisms in peroxisome proliferator-activated receptor gamma are associated with Type 2 diabetes mellitus and obesity in the Korean population. *Diabet Med.* 2005;22(9):1161-6.
63. Tavares V, Hirata RD, Rodrigues AC, Monte O, Salles JE, Scalissi N, Speranza AC, Hirata MH. Association between Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma2 gene and insulin sensitivity in Brazilian patients with type-2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab.* 2005;7(5):605-11.
64. Ridker PM, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Plutzky J, Zee RY. Alanine for proline substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 (PPARG2) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(5):859-63.
65. Doney AS, Fischer B, Leese G, Morris AD, Palmer CN. Cardiovascular risk in type 2 diabetes is associated with variation at the PPARG locus: a Go-DARTS study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(12):2403-7.
66. Anghel S, Wahli W. Fat poetry: a kingdom of PPAR gamma. *Cell Res.* 2007. 17:486-511

67. Belcaro G, Laurora G, Cesarone MR, De Sanctis MT, Renton S, Chong LC. Evaluation of arteriosclerosis progression with ultrasonic biopsy and intima-media thickness measurements. *Vasa*. 1993;22(1):15-21.
68. Temelkova-Kurktschiev T, Hanefeld M, Chinetti G, Zawadzki C, Haulon S, Kubaszek A, Koehler C, Leonhardt W, Staels B, Laakso M. Ala12Ala genotype of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 protects against atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(9):4238-42.
69. Laakso M. Gene variants, insulin resistance, and dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15(2):115-20.
70. Andrulionyte L, Zacharova J, Chiasson JL, Laakso M; STOP-NIDDM Study Group. Common polymorphisms of the PPAR-gamma2 (Pro12Ala) and PGC-1alpha (Gly482Ser) genes are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes in the STOP-NIDDM trial. *Diabetologia*. 2004; 47(12):2176-84.
71. Florez JC, Hirschhorn J, Altshuler D. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2003;4:257-91. Review
72. Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, Andres R, Roth J, Shuldiner AR. Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes*. 1998;47(11):1806-8.
73. Ek J, Urhammer SA, Sorensen TI, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O. Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia*. 1999;42(7):892-5.
74. Fornage M, Jacobs DR, Steffes MW, Gross MD, Bray MS, Schreiner PJ. Inverse effects of the PPAR(gamma)2 Pro12Ala polymorphism on measures of adiposity over 15 years in African Americans and whites. The CARDIA study. *Metabolism*. 2005 Jul;54(7):910-7.

75. Li S, Chen W, Srinivasan SR, Boerwinkle E, Berenson GS; The Bogalusa Heart Study. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene polymorphism (Pro12Ala) beneficially influences insulin resistance and its tracking from childhood to adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Diabetes*. 2003; 52(5):1265-9.
76. Masud S, Ye S & SAS group. Effect of the peroxisome proliferator activated receptor- γ gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. *Journal of Medical Genetics* 2003; 40:773-780
77. Hawkins M, Rossetti L. Insulin resistance and its role in the pathogenesis of type 2 diabetes. Editors; Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. *Joslin's Diabetes Mellitus*, fourteenth edition, Lippincott Williams&Wilkins, 2005:425-448
78. Mousavinasab F, Tahtinen T, Jokelainen J, Koskela P, Vanhala M, Oikarinen J, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M. Common polymorphisms in the PPARgamma2 and IRS-1 genes and their interaction influence serum adiponectin concentration in young Finnish men. *Mol Genet Metab*. 2005; 84(4):344-8.
79. Ostergard T, Ek J, Hamid Y, Saltin B, Pedersen OB, Hansen T, Schmitz O. 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.
80. Jacob S, Stumvoll M, Becker R, Koch M, Nielsen M, Loblein K, Maerker E, Volk A, Renn W, Balletshofer B, Machicao F, Rett K, Haring HU. The PPARgamma2 polymorphism pro12Ala is associated with better insulin sensitivity in the offspring of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res*. 2000;32(10):413-6.
81. Koch M, Rett K, Maerker E, Volk A, Haist K, Deninger M, Renn W, Haring HU. The PPARgamma2 amino acid polymorphism Pro12Ala is prevalent in offspring of type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. *Diabetologia*. 1999;42(6):758-62.

82. 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;86(2):536-41.
83. 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;69(3):455-60.
84. Perseghin G, Ghosh S, Gerow K, Shulman GI. Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents:a cross-sectional study. *Diabetes.* 1997;46(6):1001-9.
85. Strojek K, Grzesczak 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
86. Strackowski M, Kowalska I, Stepień A, et al. Insulin resistance in first-degree relatives of persons with type 2 diabetes. *Med Sci Monit.* 2003;9(5):CR186-90
87. Srinivasan SR, Frontini MG, Berenson GS; Bogalusa Heart Study. 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 451-3
88. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R: glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.*1979; 237(3):E214-E223)
89. Anderwald C, Anderwald-Stadler M, Promintzer M, et al. The Clamp-Like Index. *Diabetes Care.* 2007;30(9):2374-80
90. Kowalska I, Strackowski M, Nikołajuk A, Krukowska A, Kinałska I, Górska M. Plasma adiponectin concentration and tumor necrosis factor- α system activity in lean non-diabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Eur J Endocrinol.* 2006 Feb;154(2):319-24

91. Stumwoll M, Fritsche A, Häring H. The OGTT as test for beta cell function? *Eur J Clin Invest.* 2001;31(5):380-1
92. Lihn AS, Ostergard T, Nyholm B, Pedersen SB, Richelsen B, Schmitz O. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Feb;284(2):E443-8
93. Pellme F, Smith U, Funahashi T, et al. Circulating adiponectin levels are reduced in non-obese but insulin resistant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2003;52(5):1182-6
94. Lattuada G, Sereni LP, Ruggieri D, et al. Postabsorptive and insulin-stimulated energy homeostasis and leucine turnover in offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2004 27(11):2716-22
95. Civitarese AE, Jenkinson CP, Richardson D, et al. Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2004, 47(5): 816–820
96. Kriketos AD, Greenfield JR, Peake PW, et al. Inflammation, insulin resistance and adiposity. A study of first-degree relatives of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care.* 2004, 27(8): 2033–2040
97. Ezenwaka CE, Kalloo R, Uhlig M, Eckel J. Relationship between Adiponectin and Metabolic Variables in Caribbean Offspring of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Horm Metab Res.* 2004;36(4):238-42
98. Petersen KF, Dufour S, Befray D, Garcia R & Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J of Med* 2004 350(7): 664–671. Abstract
99. Otsuka F, Kojima S, Maruyoshi H, Kojima S, et al. Smoking cessation is associated with increased plasma adiponectin levels in men. *J Cardiol.* 2009;53(2):219-25
100. Kapoor D, Jones TH. Smoking and hormones in health and endocrine disorders. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(4):491-9
101. Miyazaki T, Shimada K, Mokuno H, Daida H. Adipocyte derived plasma protein, adiponectin, is associated with smoking status in patients with coronary artery disease. *Heart* 2003;89:663

102. Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, et al. Association of hypoadiponectinemia with smoking habit in men. *Hypertension* 2005;45(6):1094-100
103. Otsuka F, Kojima S, Maruyoshi H, Kojima S, et al. Smoking cessation is associated with increased plasma adiponectin levels in men. *J Cardiol.* 2009;53(2):219-25
104. Efstathiou SP, Skeva II, Dimas C, et al. Smoking cessation increases serum adiponectin levels in an apparently healthy Greek population. *Atherosclerosis.* 2009;205(2):632-6
105. Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE. *BMJ.* Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. 1989;298(6676):784-8
106. Tröbs M, Renner T, Scherer G, et al. Nutrition, Antioxidants, and Risk Factor Profile of Nonsmokers, Passive Smokers and Smokers of the Prevention Education Program (PEP) in Nuremberg, Germany. *Prev Med.* 2002;34(6):600-7
107. Sparks LM, Pasarica M, Sereda O, et al. Effect of adipose tissue on the sexual dimorphism in metabolic flexibility. *Metabolism.* 2009;58(11):1564-71. Abstract.
108. Plaisance EP, Grandjean PW, Judd RL, Jones KW, Taylor JK. The influence of sex, body composition, and nonesterified fatty acids on serum adipokine concentrations. *Metabolism.* 2009 Nov;58(11):1557-63. Abstract
109. Rattarasarn C, Leelawattana R, Soonthornpun S. Contribution of skeletal muscle mass on sex differences in 2-hour plasma glucose levels after oral glucose load in Thai subjects with normal glucose tolerance. *Metabolism.* 2009 Sep.
110. Bendlová B, Vejrazková D, Vcelák J, et al. PPAR γ 2 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

111. Nelson TL, Fingerlin TE, Moss LK, Barmada MM, Ferrell RE, Norris JM. The role of the Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor γ in diabetes risk. *Metabolism*. 2007 Mar;56(3):388-93
112. Franks PW, Luan J, Browne PO, et al. Does peroxisome proliferator-activated receptor gamma genotype (Pro12ala) modify the association of physical activity and dietary fat with fasting insulin level? *Metabolism* 2004; 53:11–16
113. Tönjes A, Scholz M, Loeffler M, Stumvoll M. Association of Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma with Prediabetic phenotypes: meta-analysis of 57 studies on nondiabetic individuals. *Diabetes Care* 2006; 29:2489–2497)
114. Li LL, Ma XL, Ran JX, et al. Genetic polymorphism of peroxisome proliferator activated receptor-gamma2 Pro12Ala on ethnic susceptibility to diabetes in Uygur, Kazak and Han subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35(2):187-91
115. Tok EC, Ertunc D, Bilgin O, Erdal EM, Kaplanoglu M, Dilek S . PPAR-g2 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
116. Yilmaz M, Ergün MA, Karakoç A, et al. Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene in first-degree relatives of subjects with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2005;21(4):206-10
117. Atug O, Tahan V, Eren F, et al. Pro12Ala polymorphism in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma (PPAR γ) gene in inflammatory bowel disease. *J Gastrointest Liver Dis*. 2008;17(4):433-7
118. Kao WH, Hsueh WC, Rainwater DL, et al. Family History of Type 2 Diabetes Is associated with increased carotid artery intimal-medial thickness in Mexican Americans. *Diabetes Care*. 2005;28(8):1882-9
119. Cardellini M, Marini MA, Frontoni S, et al. Carotid artery intima-media thickness is associated with insulin-mediated glucose disposal in nondiabetic normotensive offspring of type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(1):E347-52

120. Fröhlich M, Imhof A, Berg G, et al. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care*. 2000; 23(12):1835-1839
121. Tesauro M, Rizza S, Iantorno M, et al. Vascular, metabolic, and inflammatory abnormalities in normoglycemic offspring of patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2007;56(3):413-9
122. Kriketos AD, Greenfield JR, Peake PW, et al. Inflammation, insulin resistance, and adiposity. *Diabetes Care*. 2004;27(8):2033-40
123. Rogowski O, Zeltser D, Shapira I, et al. Gender difference in c-reactive protein concentrations in individuals with atherothrombotic risk factors and apparently healthy ones. *Biomarkers*. 2004;9(1):85-92
124. Saltevo J, Vanhala M, Kautiainen H, Kumpusalo E, Laakso M. Levels of adiponectin, C-reactive protein and interleukin-1 receptor antagonist are associated with insulin sensitivity: a population-based study. *Diabet Med*. 2008;25(6):747-50
125. Majka DS, Chang RW, Vu TH, et al. Physical activity and high-sensitivity c-reactive protein:the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Am J Prev Med*. 2009;36(1):56-62