T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLP–1 RESEPTÖR POLİMORFİZMLERİNİN OBEZİTEYE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MAHAFARİN MARALANİ

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
İZMİR-2014

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc/2011970128

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLP–1 RESEPTÖR POLİMORFİZMLERİNİN OBEZİTEYE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAHAFARİN MARALANİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. AYFER ÜLGENALP

Bu tez, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında

DEÜ 2013.KB.SAG.241 no ile desteklenmiştir.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Mahafarin Maralani 'GLP-1Reseptör Polimorfizmlerinin Obeziteye Olan Etkilerinin Araştırılması' konulu Yüksek Lisans tezini 22.12.2014 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN
Prof. Dr. Ayfer Ülgenalp

ÜYE
Prof. Dr. Gül Güner Akdoğan

ÜYE
Yard. Doç. Dr. Tufan Çankaya

ÜYE
Prof. Dr. Nur Arslan

ÜYE
Yard. Doç. Dr. Elçin Bora

YEDEK ÜYE
Yard. Doç. Dr. Mehtap Yüksel Eğrilmez

YEDEK ÜYE
Doç. Dr. Sefa Kızıldağ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER iii
TABLOLAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
ÖZET 1
ABSTRACT 3
1. GİRİŞ VE AMAÇ 5
2.GENEL BİLGİLER 6
2.1. OBEZİTE 6
2.1.1 GİRİŞ 6
2.1.2. Obezitenin Farklı Etnik Kökenlerdeki (Türkiye'de) Yaygınlığı 6
2.1.3. Obezitenin Genetiği 6
2.2. DİYABET 8
2.2.1. Diyabetin Sınıflandırılması 8
2.2.2. Diyabetin Komplikasyonları 9
2.2.2.1. Diyabet Gelişen Salgın 9
2.2.2.2. İnsülin ve Diyabet 10
2.2.3. Diyabet ve İnkretin Hormonları 10
2.2.3.1. İnkretin Etkisi 10
2.2.3.2. İnkretin Hormonları 11
2.3. NAFLD (alkolik olmayan yağlı karaciğer) 12
2.3.1. Patoloji 12
2.3.2. Epidemiyoloji 12
2.3.3. NAFLD, Obezite, Diyabet İlişkisi 13
2.4. GLP-1 13
2.4.1. GLP-1'nin Biyolojik Etkileri 13
2.4.2. GLP-1'in Etkilerinin Kısıtlamaları 14
2.4.3. GLP-1'in Klinikte Kullanımı 14
2.5. GLP-1 Reseptörü 16
2.5.1. Giriş 16
2.5.2. GLP-1R Aktivasyonu 17
2.5.3. GLP-1R Sinyal Mekanizması 17
2.5.4. GLP-1 ve GLP-1R Genetik Bakış 18
3.GEREÇ VE YÖNTEM 21
3.1. Araştırmanın Tipi: 21
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı: 21
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi / Çalışma Grupları: 21
3.4. Çalışma Materyali: 21
3.5. Araştırmanın Değişkenleri: 21
3.6. Veri Toplama Araçları: 22
3.6.1. Bilgi Toplama: 22
3.6.2. Kullanılan Cihazlar: 22
3.6.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler: 23
3.6.4. Araştırmanın Yöntemi: 23
3.6.4.1. Olgu Gurupların Belirlenmesi ve Örnek Alımı: 24
3.6.4.2. Kan Örneklerinden DNA Eldesi ve Kalite Kontrolü: 25
3.6.4.2.1. Kandan DNA İzolasyonu: 25
3.6.4.2.2. DNA'ların Nanodrop ile Ölçümü: 26
3.6.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): 26
3.6.4.3.1. PZR İçin Primerlerin Tasarlanması: 26
3.6.4.3.2. Primerlerin Sulandırılması: 26
3.6.4.3.4. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel ile Kontrolü: 28
3.6.4.4. DNA Dizi Analizi (Sekans Analizi): 29
3.6.4.4.1. İlk Pürifikasyon: 29
3.6.4.4.2. İkinci Amplifikasyon (Sekans amplifikasyonu): 29
3.6.4.4.3. İkinci Pürifikasyon: 31
3.6.4.4.4. PZR Ürünlerinin Cihaza Yüklenmesi: 31
3.6.4.4.5. Dizi Analizi: 31
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi: 32
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi: 32
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları: 32

3.10. Etik Kurul Onayı: 33
4. BULGULAR 34
4.1. Çalışma Guruplarının Oluşturulması: 34
4.2. Olgulardaki İnsülin Direnci ve Yağlı Karaciğer Görülme Sıklığı: 34
4.3. DNA İzolasyonunun Kontrolü: 35
4.4. PZR ve PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi: 36
4.5. DNA Dizi Analizi: 37
4.6. Çalışmada Saptanan Mutasyonlar ve Polimorfizmler: 37
4.7. rs6918287 (G>A) Polimorfizmi: 40
4.8. rs3765468 (G>A) Polimorfizmi: 44
4.9. rs6923761 (G>A) Polimorfizmi: 48
4.10. R131Q Mutasyonu: 53
5.TARTIŞMA 54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 59
7. KAYNAKLAR 60
8.EKLER 80
Ek-1: Bilgilendirilmiş Olur Formu 80
Ek-2: Etik Kurul Onayı 82
Ek-3: Özgeçmiş 83

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Araştırmada Kullanılan Aletler ve Markaları. 22
Tablo 2. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler 23
Tablo 3. Kandan DNA İzolasyonu İçin Gerekli Alet ve Kimyasal Listesi 25
Tablo 4. GLP-1R Geni Ekzon 2, 4 ve 5 Primerleri 26
Tablo 5 . DNA Amplifikasyonu İçin Gerekli Alet ve Kimyasallar Listesi 27
Tablo 6. PZR İçin Hazırlanan Karışım (örnek başına) 27
Tablo 7. Kullanılan PZR Programı 28
Tablo 8. Jel Elektroforez İçin Gerekli Alet ve Kimyasal Listesi 29
Tablo 9. İkinci Amplifikasyon İçin Gerekli Alet ve Kimyasal Listesi 30
Tablo 10. İkinci Amplifikasyon İçin Uygulanan Protokol 30
Tablo 11. İkinci Amplifikasyon İçin Koşullar 31
Tablo 12. İnsülin Direnci ve Karaciğer Yağlanması Arasındaki İlişki 35
Tablo 13. Olgulardan Bazılarının DNA Saflık Değerleri ve Konsantrasyonları 36
Tablo 14. GLP-1R Geni Ekzon 4 ve 5'te saptanan Polimorfizmler ve Olgulardaki Genotip Dağılımları 38
Tablo 15. rs6918287 Polimorfizmi Genotip Dağılımları 41
Tablo 16. Cinsiyet ve rs6918287 Polimorfizmi Genotipleri Arasındaki İlişki 42
Tablo 17. Boy - VKİ - Ağırlık - Boya göre Ağırlık İle rs6918287 Polimorfizmi Genotipleri Arasındaki İlişki 42
Tablo 18. Karaciğer Yağlanması İle rs6918287 Polimorfizmi Geneotipleri Arasındaki İlişki 43
Tablo 19. İnsülin Direnci İle rs6918287 Polimorfizmi Geneotipleri Arasındaki İlişki 43
Tablo 20. Karaciğer Yağlanması ve rs6918287 Polimorfizmi Allel Sıklıkları Arasındaki İlişki 44
Tablo 21. İnsülin Direnci ve rs6918287 Polimorfizmi Allel Sıklıkları Arasındaki İlişki 44
Tablo 22. rs3765468 Polimorfizmi Genotip Dağılımları 45
Tablo 23. Cinsiyet ve rs3765468 Polimorfizmi Genotipleri Arasındaki İlişki 46
Tablo 24. Boy - Kilo – VKİ - Boya göre Ağırlık ile rs3765468 Polimorfizmi Genotipleri Arasındaki İlişki 46
Tablo 25. Karaciğer Yağlanması ve rs3765468 Polimorfizmi Genotipleri Arasındaki İlişki 47
Tablo 26. İnsülin Direnci ve rs3765468 Polimorfizmi Genotipleri Arasındaki İlişki 47
Tablo 27. Karaciğer Yağlanması ve rs3765468 Polimorfizmi Allel Sıklıkları Arasındaki İlişki 48
Tablo 28. İnsülin Direnci ve rs3765468 Polimorfizmi Allel Sıklıkları Arasındaki İlişki 48
Tablo 29. rs6923761 Polimorfizmi Genotip Dağılımları 49
Tablo 31. Boy – Kilo - VKİ - Boya göre Ağırlık İle rs6923761 Polimorfizmi Genotipleri Arasındaki İlişki 50
Tablo 32. Boy – Kilo - VKİ - Boya göre Ağırlık İle rs6923761 Polimorfizmi Genotipleri Arasındaki İlişki (*Mann Whitney-U* testi) 51
Tablo 33. Karaciğer Yağlanması ve rs6923761 Polimorfizmi Genotipleri Arasındaki İlişki 51
Tablo 34. İnsülin Direnci ve rs6923761 Polimorfizmi Genotipleri Arasındaki İlişki 52
Tablo 35. Karaciğer Yağlanması ve rs6923761 Polimorfizmi Allel Sıklıkları Arasındaki İlişki 52
Tablo 36. İnsülin Direnci ve rs6923761 Polimorfizmi Allel Sıklıkları Arasındaki İlişki 53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Çalışma Grubunun Cinsiyet Dağılımı 34
Şekil 2. a) Olgulardaki İnsülin Direncinin Dağılımı; b) Olgulardaki Karaciğer Yağlanmasının Dağılımı 35
Şekil 3. Olguların GLP-1R Geni Ekzon 2, 4 ve 5'e Ait Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz jel Görüntüsü.(DNA marker : O'Range Ruler 100bp DNA Ladder)..... 37
Şekil 4. GLP-1R Geni 4. ve 5. Ekzonda Saptanan Polimorfizmlerin Dizi analizi Görüntüleri: a) rs6918287 Homozigot; b) rs3765468 Heterozigot; c) rs6923761 Heterozigot 39
Şekil 5. GLP-1R Geni 4. Ekzonda Saptanan Heterozigot R131Q Mutasyonu..... 40
Şekil 6. rs6918287 Polimorfizmi Allel Sıklıkları 41
Şekil 7. rs6918287 Polimorfizminin Popülasyon Çalışmalarına Göre Allel Sıklıkları..... 41
Şekil 8. rs3765468 Polimorfizminin Allel Sıklıkları 45
Şekil 9. rs3765468 Polimorfizminin Popülasyon Çalışmalarına Göre Allel Sıklıkları..... 45
Şekil 10. rs6923761 Polimorfizminin Allel Sıklıkları 49
Şekil 11. rs6923761 Polimorfizminin Popülasyon Çalışmalarına Göre Allel Sıklıkları..... 49

KISALTMALAR

ACDC: Adiponektin
ADRB2: Beta-2 Adrenerjik Reseptör
ADRB3: Beta-3 Adrenerjik Reseptör
CALCR: Kalsitatin
cAMP: Siklik AMP
cAMP-GEF11 veya Epac2: Guanin nükleotid Değişim Faktörü
cDNA: Komplementer DNA
CREB: cAMP'ye Yanıt Veren Bağlanma Proteini
DPP-4: Dipeptidil Peptidaz 4
EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
G protein: Guanin Nükleotid Bağlayıcı Protein
GIP: Gastrik İnhibitör Polipeptid
GIPR: GIP Reseptörü
GLP-1: Glukagon Benzeri Peptid-1
GLP-1R: GLP-1 Reseptörü
GNB3: Beta Polipeptidaz
GPCR: G-protein Bağlanan Reseptör
GS: Uyarıcı G Protein
HOMA-IR: İnsülin Direnci Homeostaz Modeli Değerlendirilmesi
IL6: İnterlökin 6
KAPT: ATP'ye Hassas Potasyum Kanalı
KC: Karaciğer
Kr: Lambada Katsayısı
LDLR: Düşük Dansiteli Lipo Protein Reseptörü
LEP: Leptin
LEPR: Leptin Reseptör
MC4R: Melano Kortin Reseptör 4
NAFLD: Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer
NASH: Alkolik Olmayan Steatohepatit
NR3CI: Gluko Kortikoid Reseptör
OR: Olasılık Oranı
PPARG: Peroksizom Çoğaltıcı-Aktiv Edici Reseptör Gama
PTHR: Paratiroid Hormonu
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTLs: Nicel Özellik Noktaları
RETN: Rezistin
SCTR: Sekretin
SD: Standart Sapma
SNP: Tek Nükleotid Polimorfizm
T1DM ve T2DM: Tip 1 ve Tip 2 Diyabet Mellitus
TBE: Tris-Borat-EDTA
TNFA: Tümör Nekroz Faktör Alfa
UCP1, E1CP2 ve UCP3: Bağlanmayan Protein 1, 2 ve 3
USG: Ultrasonografisi
VKİ: Vücüt Kitle İndeksi

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden yardımını esirgemeyen, kapısı her zaman bana açık olan tez danışmanım Dr. Ayfer ÜLGENALP'e en içten teşekkürlerimi sunmak istiyorum.

Türkiye'deki eğitimim başladığı günden bugüne, bilgi ve destekleri ile bizleri motive eden Moleküler Tıp Anabilim Dalı başkanı Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN'a en samimi duygularımla teşekkür etmek istiyorum.

Çalışma sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim sürecinde karakteri ve meslek etiğiyle bana örnek olan Dr. Tufan ÇANKAYA'ya teşekkür ederim.

Tezin sonuçlarını değerlendirme ve yorumlamamda bana destek olan Dr. Esra ATAMAN'a, hep sabırlı ve güler yüzlü olduğu için içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmam boyunca hastaların toplanmasından sonuçların analizine kadar geçen süreçte, desteğini eksik etmeyen Dr. Nur ARSLAN'a teşekkür etmek isterim.

Araştırma süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Yük. Bio. Erkan KAYTANTAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen tüm hocalarıma, arkadaşlarıma özellikle Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ailesindeki hocalar, asistanlar ve teknik elemanlarına, ayrıca Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrenci işlerine, bana gösterdikleri sevgi ve destekten ötürü teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GLP-1RESEPTÖR POLİMORFİZMLERİNİN OBEZİTEYE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Mahafarin Maralani)

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Programı

Pankreas β-hücrelerinden salınan GLP-1, GLP-1 reseptörü (GLP-1R) ile bağlanarak insülin salınımını arttırır. GLP-1'in diyabetle olan ilişkisi dışında kilo alımı ve obezite üzerine de etkileri mevcuttur.

GLP-1R geninde olası genetik değişiklikler, genotiple ilişkili olarak obezitenin görülme sıklıkları üzerine değişiklik yaratabilir. Bu amaçla, GLP-1R geninde olası mutasyon/tek gen polimorfizmlerini (SNP) bulmayı hedefledik. Kilo artışı veya obezitesi olan toplam 162 olgu, GLP-1R geni açısından analiz edilmiştir.

Bu gendeki genetik değişiklikleri gösterebilmek için, literatürde tariflenmiş değişiklikler kontrol edildi ve bu nedenle değişikliklerin en sık bulunduğu üç ekzon tümüyle dizilendi. Analiz sonucu, GLP-1R'nin dördüncü ve beşinci ekzonlarında üç polimorfizm ve bir mutasyon tespit edildi. Yapılan istatistik değerlendirmeleri sonucunda, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığına sahip grup ile insülin direnci gösteren grup arasında allel frekansları açısından anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). İncelenen gende heterozigot, homozigot ve yabanıl tip arasında, vücut kütle indeksi, ağırlık, boy ve bunun gibi diğer obezite değişkenleri açısından, istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0,05$). Olgulardan üçünde R131Q mutasyonu bulundu. Bu olgulardan birinde yağlı karaciğer bulunmakta iken hiç birinde insülin direnci gözlenmedi. Bulduğumuz polimorfizmlerin ilki rs6918287 idi. Bu polimorfizmi heterozigot olarak taşıyan bireylerde insülin direnci riskinin iki kat arttığı görüldü ve bu polimorfizmi taşıyan bireylerde A alleline sahip olanların karaciğer yağlanması için iki kat daha fazla risk taşıdığı tespit edildi. İkinci bulduğumuz polimorfizm, rs3765468 idi. Bu polimorfizmi homozigot taşıyan bireyler, heterozigot olanlara göre üç kat artmış karaciğer yağlanması riski içermekteydi. Son bulduğumuz polimorfizm olan rs6923761'i heterozigot taşıyan bireylerde artmış karaciğer yağlanması ve azalmış insülin direnci varken homozigot bireylerde insülin direncinde azalma görüldü.

GLP-1R geninde görülen genetik değişikliklerin, elde edilen olasılık oranları nedeniyle, obezite ve diyabet gelişimi üzerine etki edebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle GLP-1R geni üzerinde görülen değişikliklerin ileri araştırılması ve tüm ekzonların dizilemesi ile fonksiyonel analizinin yapılması planlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: GLP-1, GLP-1R**,** SNP, Obezite

ABSTRACT

Masters Thesis

INVESTIGATION OF GLP-1RECEPTOR POLYMORPHISMS EFFECTS ON OBESITY

(Mahafarin Maralani)

Dokuz Eylul University Health Science Institute
Molecular Medicine Department
Masters Program

Secreted GLP-1binds to GLP-1 receptor (GLP-1R) on the pancreatic β-Cells augmenting insulin secretion. Other effects of GLP-1however shows connections between it's signaling and obesity besides diabetes.

To address the possibility that genetic variation of GLP-1R gene could cause changes in ratios of obesity according to the genotypes, we tried to detect the mutation/SNP in GLP-1R. Genomic DNA was extracted from 162 overweight or obese patients and sequenced for the GLP-1R gene.

To clarify the polymorphisms of this gene, hot-spots were selected and patients were screened by full exon sequencing and association study was carried out. Three polymorhisms and one mutation were detected in forth and fifth exons of GLP-1R gene. There were no significant differences in allel frequencies of these polymorphisms between groups with NAFLD or insülin resistance, and also there were no significant differences in BMI, weight, height and other obesity related factors among the wild type, heterozygote and homozygote of these varients in patients ($p>0,05$). RI3IQ mutation was detected in three cases from which 1/3 had fatty liver but none showed insulin resistance. There was also statisticaly meaningful results for 'Odds Ratio' among different genotypes and allel frequencies in groups with fatty liver and/or insulin resistance. One of our polymorphisms was rs6918287 for which in heterozygot group we detect double risk of insulin resistance. Patients with A allel also show approximately doubled risk for fatty liver occurance. However for rs3765468 we have tripled risk for insulin resistance in homozygot individuals and around double probability for fatty liver disease in heterozygot ones. The other SNP was rs6923761. In heterozygot individuals there is an increase in risk for fatty liver and a decrease in risk for insulin resistance. In homozygot group also the prospect of insulin resistance is double declined. Patients with A allel of this polymorphism show a drop in risk for insulin resistance as well.

GLP-1R polymorphisms could influence effects of GLP-1 on obesity and diabetes and thus the functional analysis of the GLP-1R polymorphisms is expected. Full exon sequencing and function analysis also remain to be examined.

Key Words: GLP-1, GLP-1R, SNP, Obesity

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Obezite, modern çağın en sık görülen problemlerinden biridir. Bu problem, endüstrileşmenin artmasıyla toplumsal bir sorun haline gelmektedir. Beslenme alışkanlıklarının düzenlenmesi ve bireysel farklılıkların ortaya çıkarılması, yeni gelişen bu durum ile mücadelede büyük yarar sağlayacağı düşünülmektedir. Bireysel farklılıkların en önemli nedeni, kişiler arasındaki genetik değişikliklerdir (Beinborn M ve ark., 2005).

Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve ilgili reseptörünün, insülin salınımı üzeine etkisi tespit edilmiş ve bunun dışında literatürde beslenme alışkanlıkları üzerine etkisi ile obezitenin gelişiminde rol oynadığı görülmüştür. GLP-1 reseptörü (GLP-1R) üzerinden etki eden hormon ve nöro-transmiterlerin, insan glukoz metabolizmasının düzenlemesinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu metabolizmanın etkisinin GLP-1 reseptörü üzerinden gerçeklesen yolaklar, bireylerde diyabet, glukoz metabolizma bozuklukları ve/veya obezitenin gelişimine etki ettiğine işaret etmektedir.

Obezitenin gelişiminde GLP-1-R geninin polimorfizm/mutasyonlarının etki edip etmediğinin anlaşılması için hipotezimizi; GLP-1R geninde görülen genetik değişiklikler obezite gelişimine etki etmektedir şeklinde kurguladık (Lamont B J ve ark., 2012; Tokuyama Y ve ark. 2004; Van Hoek M ve ark. 2008).

Bu proje önerisi, GLP-1R nin genetik özelliklerini ortaya çıkarmak ve toplumsal değişiklikleri ortaya koymak için Türkiye' de yapılmış ilk çalışma, aynı zamanda obezite ile ilişkisinin gösterilmesine olanak sağlayacak literatürdeki ilk araştırmadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. OBEZİTE

2.1.1. GİRİŞ

Kalori alımı ile kalori harcanması arasında bir dengesizlik olması durumunda obezite ortaya çıkar. Obezite, dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen önemli bir sağlık problemidir ve sorun artık epidemi şeklinde izlenmektedir. Bugün itibari ile ABD'de yaklaşık yüz yirmi yedi milyon yetişkin aşırı kilolu, altmış milyon obez ve dokuz milyondan fazla şiddetli obez olgusunun olduğu görülür ve bu rakamlar yetişkin nüfusunun %65'ini kapsamaktadır. Bin dokuz yüz seksen yılından bu yana bu rakamlar yaklaşık %20 artış göstermiştir ve bu sayıların önümüzdeki yirmi yıl içinde önemli bir ölçüde artacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, obezite kendisi ile ilişkisi olan hastalıkların ekonomik maliyetleri sebebi ile önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Flegal K M ve ark., 1998).

Obezitenin, tip-2 diyabet, hipertansiyon, dislipidemi, kanser, osteoporoz ve kardiyovasküler hastalıklar dahil birçok ciddi sağlık problemi ile ilişkisi vardır. Obezite, genetik ve çevresel faktörlerin birlikte çalıştığı çok faktörlü bir hastalıktır. Genetik, davranışsal, sosyo-ekonomik, kültürel ve çevresel etkiler gibi birçok faktör, obezitenin gelişimini daha da karmaşık hale getirmektedir.

2.1.2. Obezitenin Farklı Etnik Kökenlerdeki (Türkiye'de) Yaygınlığı

Obezite, Türkiye'de her geçen gün görülme sıklığı artmakta olan bir problem olarak değerlendirilmektedir. Obezite prevelansı yetişkinlerde 1990 yılında %18,6 iken, on yıl içinde %21,9'e yükselmiştir. Bu artış, %17,7'lik bir nispi artış hızı göstermekte ve sorunun yıllara bağlı olarak arttığına işaret etmektedir. Türkiye'de de çoğu ülkede olduğu gibi aşırı kiloluluk, erkeklerde daha sık görülürken; obezite, kadınlarda daha yaygındır (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15655033, June 2014).

2.1.3. Obezitenin Genetiği

Genetik ve çevresel faktörlerin obeziteye olan etkileri çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiştir. Çoğu çalışmada, genetik faktörlerin, vücut kütle indeksi (VKİ) değişikliklerine yaklaşık %30 ile %40 katkıda bulunduğu, çevresel faktörlerin ise %60 ile %70 oranında ilişkili olduğu

belirtilmiştir. Ayrıca bu iki faktör arasında büyük bir etkileşim söz konusudur. Birçok kişi genetik olarak obeziteye yatkın olabilir; ancak yüksek yağlı diyet ya da sedanter yaşam tarzı gibi bazı çevresel faktörlere maruz kalınca obezite ortaya çıkar (Stunkard A J, 1988). İkiz çalışmaları, obezitenin büyük ölçüde çevresel faktörlere değil, genetik faktörlere bağlı olduğunu göstermiştir. Doğumdan sonra farklı ortamlarda yetiştirilmiş tek yumurta ikizlerinin VKİ'leri arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Ayrıca evlatlık çocuklarla yapılan araştırmalarda, VKİ'leri ile kendi biyolojilik ebeveynlerininkiler arasında korelasyon olduğu görülmüş ve böyle bir ilişkinin evlat edinen ebeveyn ve evlat edinilen çocuk arasında aynı ortamda yaşamalarına rağmen bulunmadığına işaret etmiştir (Price R A ve ark., 1987).

Birçok kompleks hastalık nitel analizden daha ziyade nicel karakter analizleri ile ölçülmektedir. VKİ, boy ve kan basıncı gibi nicel özellikler, popülasyon genelinde sürekli ölçülebilir ve dağıtılabilir özelliklerdir. Diğer taraftan, niteliksel özellikler vardır ki bunlar bir hastalığın var olup olmadığını gösterir. Mesela, obezite gibi kompleks bir hastalıkta, kantitatif yağlanmayı belirtmek için, vücut kitle indeksi, bel ölçümleri, deri altı ve iç organ çevresi yağ doku ölçümleri dahil olmak üzere birçok farklı ölçüm yönteminden yararlanılmaktadır. Bu ölçütlerden faydalanılarak, farklı toplumlarda, obezitenin kalıtsal olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Kalıtım, genetik faktörlerin, fenotipe yansıma derecesini gösteren bir ölçüdür. Obezite gibi yaygın, karmaşık hastalıklarda, çevresel faktörlere ek olarak birkaç gen ya da genlerin belli bir grubu fenotipe katkıda bulunur. VKİ'in kalıtım değerinin incelenen nüfusa bağlı olarak, %25 ile %53 arasında bulunduğu tahmin edilmektedir (Vogler G P ve ark. 1995; Adeyemo A ve ark., 2003; Perusse L ve ark., 1996). Bu değer visseral ve deri altı yağ dokusu için %50-55 ve % 40 oranında bulunmuştur (Perusse L ve ark., 1996). Bununla birlikte, biyolojik ebeveyni obez olan çocuğun obez olma riskinin oranını tariflenmesinde kullanılan lambada katsayısının (Kr), aile geçmişinde obezite olan bir bireyde iki ile üç kat daha fazla olacağı tahmin edilmektedir (Risch N, 1990). Bu rakam şiddetli obez bireylerde 5-8 katına kadar çıkabilmektedir (Bouchard C, 2001).

Araştırmacılar, aday gen analizlerinden, tüm genom taramaları ve olgu çalışmaları da dâhil olmak üzere çeşitli yaklaşımlarla, obezitenin gelişiminden sorumlu genleri ortaya çıkarmaya çalışmaktadırlar. Perusse, insan gen-obezite haritası ile ilgili Ekim 2004 tarihinde yayınlanmış verilerin birçoğunu özetlemiştir. Bugüne kadar, obezite fenotipleri için Y kromozomu hariç bütün kromozomlarda insan için 204 adet nicel özellik noktası (QTLs) ve

hayvan modellemeleri için 221 noktada QTLs bulunmuştur. Bu çalışmalarda, 358 olgu incelenmiş ve sonuç olarak 113 aday gen bulunmuştur (Perusse L ve ark., 2005).

Bu replike olan genler; adiponektin (ACDC), beta-2 adrenerjik reseptör (ADRB2), beta-3 adrenerjik reseptör (ADRB3), guanin nukleotid-bağlayıcı protein (G protein), beta polipeptidaz (GNB3), interlökin 6 (IL6), insülin, düşük dansiteli lipo protein reseptörü (LDLR), leptin (LEP), leptin reseptör (LEPR), lipaz, melano kortin reseptör 4 (MC4R), gluko kortikoid reseptör (NR3CI), peroksizom çoğaltıcı-aktiv edici reseptör gama (PPARG), reziztin (RETN), tümör nekroz faktör alfa (TNFα) ve bağlanmayan protein 1, 2 ve 3 (UCP1, E1CP2 ve UCP3) olarak bilinmektedir. Hem aday genlerdeki hem de QTL bölgelerindeki replikasyon sayısının az olması şaşırtıcı değildir; çünkü obezite karmaşık bir hastalıktır ve büyük bir olasılıkla birçok gen fenotip ile ilişkili olabilir. Çalışmalar arasındaki değişik etnik gruplar ve çalışma popülasyonu farklılıkları, katılımcıların yaşı, çevresel etkiler, ölçülen fenotipler gibi bireysel farklılıklar çelişkili sonuçlar doğurabilmektedir.

2.2. DİYABET

2.2.1. Diyabetin Sınıflandırılması

Diyabet, değişik tiplere ayrılabilen bir hastalığı açıklayan terimdir. Diyabetin iki ana tipi vardır; Tip 1 diyabet ve tip 2 diyabet.

Tip 1 diyabet, genellikle insüline bağımlı veya genellikle erken başlayan diyabet olarak adlandırılır. Tip 1 diyabet bir kişide pankreatik beta hücreleri otoimmün süreçler tarafından yok edilir. Böylece pankreasta herhangi bir insülin üretimi olmaz. Bu nedenle Tip 1 diyabeti olan insanlar hayatta kalmak için insülin almak zorundadır.

Tip 2 diyabet, genellikle insüline bağımlı olmayan veya ileri yaşta başlayan diyabet olarak adlandırılır. Bu hastalık, insülin direnci ve/veya göreceli insülin eksikliğiyle birlikte vücudun düzgün bir şekilde insülini kullanamamasından dolayı ortaya çıkmaktadır.
Dünyada çocuklarda ve gençlerde obezite artışı nedeniyle giderek yayılmasına karşın, tip 2 diyabet genellikle geç ve orta yaşlarda ortaya çıkmaktadır (Mathis D ve ark., 2001).

Tip 2 diyabet semptomları, hastalığın gelişimi süresince açıkça gözlenemez. Bu tip diyabet tam geliştiği zaman hem insülin salgılanmasında hem insülinin etkisinde anormallikler ortaya çıkar. Bu hastalık beta hücre işlem bozukluğu ve bozulmuş insülin duyarlılığı nedeniyle oluşan bazal glukoz konsantrasyonundaki artış ile karakterize edilmektedir. Pankreatid β-hücreler kan şeker düzeyini korumak için yeterli insülin düzeyini üretemezse tip 2 diyabet ortaya çıkar. Ne insülin direncinin ne de β-hücre yetmezliğinin moleküler temeli henüz açık değildir ve tip 2 diyabetin görülme sıklığı dünyada hızla artmaktadır.

Tip 2 diyabet için risk faktörleri; ailede diyabet öyküsü, obezite, ileri yaş, fiziksel hareketsizlik, gestasyonel diyabet öyküsü, bozulmuş glukoz intoleransı ve etnik kökeni içerir. Gestasyonel diyabet, bazı kadınlarda gebelik sırasında tespit edilirken bir tür glukoz intoleransı şeklinde görülür ve daha çok ailesinde diyabet öyküsü olan ve obez kadınlarda görülmektedir. Diyabetin diğer türleri tüm diyabet vakalarının 5%'i kadardır. Diyabetin diğer spesifik türlerinin nedenleri genetik koşulları, cerrahi, ilaçlar, enfeksiyonlar, yetersiz beslenme ve diğer hastalıklar olabilir (Anderson R ve ark., 2000).

2.2.2. Diyabetin Komplikasyonları

2.2.2.1. Diyabet Gelişen Salgın

Diyabet yüksek kan şekeri seviyesiyle karakterize olan bir grup klinik bozukluk demektir. Diyabet ve komplikasyonlarının patogenezine baktığımızda, hiperglisemi hepsinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu komplikasyonlar, nefropati (Abouna G M ve ark., 1983), retinopati (Job D ve ark., 1976) sinir hücrelerinde görülen sorunlar (Dahl-Jorgensen K ve ark., 1986), makrovasküler hastalıklar (Ganda O P, 1980), bozulmuş hücresel bağışıklık (Rayfield E J ve ark., 1982), hücre büyümesinde anormallikler (Stout R W, 1982) ve hücre farklılaşması (Turner J L ve ark., 1978) gibi sorunları içerir.

Kalp hastalığı, diyabete bağlı ölümlerin önde gelen nedenleri arasındadır. Kalp hastalığı ve kalp krizi riski, diyabetik olan bireylerde iki ile dört kat daha yüksektir (Klein R, 1995).

2.2.2.2. İnsülin ve Diyabet

İnsülin hormonu, glukoz metabolizması ve enerji dengesini düzenleyen bir proteindir. Langerhans adasındaki pankreatik endokrin β-hücrelerinde insülin salgılanması, glukoz-lipid alımını, gen ekspresyonunu ve protein sentezini uyarır (Taniguchi C M ve ark., 2006; Cheatham B ve ark., 1995; Banting F G ve ark., 1922). Bu süreç, büyük ölçüde glukoza bağımlı bir süreçte inkretin hormonları tarafından kontrol edilir (Nauck M A, 2011).

Olmayan insülin üretimi ile Tip 1 diyabet, insülin direncinin gelişimi ile de tip 2 diyabet (T1DM ve T2DM) ortaya çıkar (Dupre J, 2005; Nauck M A, 2004). Ayrıca β-hücrelerinde apopitoza neden olan mutasyonlar da diyabete sebep olabilir. Diyabete neden olan başka bir etken ise insülinin ilgili reseptörü ile bağlanmasına engel olan mutasyonlardır (Hua Q, 2010).

2.2.3. Diyabet ve İnkretin Hormonları

2.2.3.1. İnkretin Etkisi

Bağırsak hormonları tarafından insülin salgılanmasının uyarılması, uygun glisemik kontrolün modifikasyonu için içsel bir mekanizma olarak hizmet vermektedir. Yemek tüketimi kan şekeri düzeylerini yükseltir ve ardından insülin salgılanmasını uyarır (Rorsman P ve ark., 2003). İnkretin etkisi yaklaşık elli yıl önce keşfedilmiştir. Deneylerde glukozun oral olarak alınmasının ardından insülin salgılanmasının arttığı görülürken, interavenoz olarak verildiğinde yeteri kadar etkin olmadığı görülmüştür (Perley M J ve ark., 1967; Elrick H ve ark., 1964).

Daha sonra glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve glukoz bağımlı insülinotropik peptid (GIP)' in besin alımını takiben pankreatik β-hücrelerinin glukoz bağımlı insülin salınışına neden oldukları gösterilmiştir (Thorens B, 1995; Efendic S ve ark., 2004; Gutniak M K ve ark., 1992; Fehmann H C ve ark., 1995; Nauck M A ve ark., 1986).

GIP ve GLP-1 in birlikte etkisinin insülin seviyelerini düzenlemek için yeterli etkinliğe sahip olduğu görülmüştür (Lindgren R E ve ark., 2009). Tokluk şekeri seviyesi bu inkretin etkisine yanıt olarak normal koşullarda 140 mg/dl altında tutulur (70-100 mg/dl). Bu nedenle iç salgı bezi etkisi (inkretin effect)'nde bozulma meydana geldiğinde kalıcı hiperglisemi

ortaya çıkar ve bu T2DM'un oluşumunu kolaylaştırır (Pratley R E ve ark., 2001; Gutzwiller J P ve ark., 1999; Drucker D J, 2003).

2.2.3.2. İnkretin Hormonları

GIP (Gastrik inhibitör polipeptid) , yağ ve karbonhidrat tüketimini takiben deodenum ve üst bağırsak K-hücrelerinden salgılanan 42 aminoasitlik bir peptidtir (Ross S A ve ark., 1978; Buchan A M ve ark., 1978). GIP, ilk olarak mide asidi salınımındaki inhibisyon etkisi ile tanınmıştır. Fakat sonraki araştırmalarda GIP'ın glukoza bağımlı bir şekilde pankraetik insülin salınımına neden olduğu gözlenmiştir (Pederson R A ve ark., 1976; Dupre J ve ark., 2002; Trumper A ve ark., 2002; Ehses J A ve ark., 2003). Adipositlerin fonksiyonel GIP reseptörlerini eksprese ettiği gözlenmiştir (Yip R G ve ark., 1998).

GIP direncinin, güçlü bir şekilde T2DM başlangıcı ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve GIP'ın insülünotropik eylemlerinin bozulması T2DM'yi GLP-1'den daha fazla etkilediği tespit edilmiştir (Meier J J ve ark., 2006; Meier J J, 2009, Vilsboll T ve ark., 2007; Elahi D ve ark., 1994; Nauck M A ve ark., 1993).

GIP reseptörü (GIPR) ne karşı gelişen direnç, GIP agonistlerinin T2DM'un tedavisinde kullanımı için önemli bir sınırlamadır.

Hormon GLP-1 pankreatik β-hücrelerinden insülin salgılanmasını uyarmak üzere içsalgı bezi etkisinin bir parçası olarak bağırsak L- hücreleri tarafından salgılanmaktadır (Kreymann B ve ark., 1987; Nauck M A ve ark., 1993; Kjems L L ve ark., 2003).

GLP-1 reseptör (GLP-1R) agonizminin, yeterli GLP-1 geni üretimine yardımcı olmak için β-hücreleri üzerinde proliferatif ve anti-apoptik etkileri vardır (Egan J M ve ark., 2003; Baggio L L ve ark., 2006; Butler A E ve ark., 2003). Yeterli içsalgı bezi tepkisi (incretin effect)'ni kontrol edememe, T2DM'de insülin direncinin karakterize bir özelliğidir (Bagger J I ve ark., 2011; Knop F K ve ark., 2007; Rask E ve ark., 2001). Yok olmaya yakın olan bir pankreas salgı bezi yanıtının yenilenmesi eksojen GLP-1 agonistinin uygulanması ile elde edilebilir (Nauck M A ve ark., 1986; Drucker D J, 2002; Nathan D M ve ark., 1992; Baggio L L ve ark., 2004). GLP-1'in 6 hafta süresince derialtı infüzyonu ile T2DM hastalarında glisemik kontrolü, insüline duyarlılığı ve β-hücre fonksiyonlarının

gelişimini sağladığı görülmüştür (Zander M ve ark., 2002). GLP-1, pankreatik hücrelerinden glukogon salınımını inhibe etmekte ve glisemi kontrolüne yardımcı olmak için mide boşalmasını geciktirmektedir (Orskov C ve ark., 1988; Schirra J ve ark., 1998; Willms B ve ark., 1996; Imeryuz N ve ark., 1997). Yetersiz içsalgı bezi yanıtından (incretin effect) dolayı aşırı glukagon salgılanması, T2DM'deki yüksek glukoz düzeyleri için kısmen sorumlu tutulmaktadır (Meier J J ve ark., 2007; Knop F K ve ark., 2007; Salehi M ve ark., 2010; Salehi M ve ark., 2008). Hepatik glukoz üretiminin önemli ölçüde pankreastan bağımsız azalması, glukagon salgılanmasının düzenlenmesinde GLP-1'in rolünün önemli olduğunu yansıtmaktadır (Prigeon R L ve ark., 2003). Sonuç olarak periferik ve santral GLP-1 yolakları arasındaki etkileşim, kan glukoz düzeylerinin düzenlemesine yardım etmektedir.

2.3. NAFLD (alkolik olmayan yağlı karaciğer)

2.3.1. Patoloji

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) günümüzde sıklıkla yaşanan bir sorun haline gelmiştir. Yağ ve şeker oranı yüksek diyetler, nüfus içinde karaciğer yağlanmasının görülme sıklığını arttırmaktadır. NAFLD, alkol kullanımı olmaksızın karaciğerde yağ birikimi ile karakterize edilir. Histolojik bulguları ise minimum alkol tüketimi olan bir kişide karaciğer yağ ağırlığının, karaciğer ağırlığının % 5-10'dan fazla olacak şekilde olmasıdır (Younossi Z M, 2008).

İnflamatuar hücre infiltrasyon eşliğinde NAFLD, alkolik olmayan steatohepatite (alkolik olmayan steatohepatit - NASH) ilerleyebilir (Gentile C L ve ark., 2008; Fujita K ve ark., 2009). NASH ise siroz ve hepatosellüler karsinomaya dönüşebilir (Bellentani S ve ark., 2010; Schreuder T C ve ark., 2008; Ding X ve ark., 2006).

2.3.2. Epidemiyoloji

NAFLD sanayisi gelişmiş ülkelerde önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Obez nüfusun % 60-70'inde karaciğer yağlanması bulunduğu tahmin edilmektedir (Schreuder T C ve ark., 2008). En tehlikelisi ise pediatrik nüfus içinde NAFLD'nin her geçen gün arttığının tespit edilmesidir (de Piano A ve ark., 2009).

2.3.3. NAFLD, Obezite, Diyabet İlişkisi

Karaciğerin sistemik insülin direnci gelişiminde önemli bir rol aldığı açıktır. Hipertrigliseridemi ve NAFLD, hepatosit ve adiposit insülin direnci ve aynı şekilde obezite ile güçlü ilişkileri vardır. Ayrıca lipit birikimi özellikle hipertrigliseridemi, T2DM ve NAFLD'nin ortak özelliği sayılabilir. Buna ek olarak NAFLD, kardiyovasküler morbidite ve mortalitesinin bağımsız bir belirleyicisidir (Sanal M G, 2008; Musso G ve ark., 2010).

2.4. GLP-1

2.4.1. GLP-1'nin Biyolojik Etkileri

GLP-1' in reseptöre bağlanması, cAMP(siklik AMP) oluşumu ile sonuçlanan adenilat siklaz aktivasyonuna neden olur (Gromada J ve ark., 1998). GLP-1'in tüm eylemlerde ikincil olarak cAMP'ın oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir. Protein kinaz A'nın aktivasyonu değiştirilmiş iyon kanal aktivitesi, hücre içi kalsiyum taşınması ve insülin içeren granüllerin gelişmiş dışa salınışına yol açar (Holz G G ve ark., 1993). GLP-1'in insülin salgılanması üzerinde, herhangi bir etkisi olması için glukozun belli bir seviyede bulunması gerekir. Buna ek olarak GLP-1, güçlü bir şekilde glukozun kendisinin insülinotropik eylemlerini takviye etmektedir. Tek β-hücre deneylerinde glukoz ve GLP-1'in ayrı olarak, hücre içi kalsiyum seviyelerini ya da zar potansiyelini etkilemeye yetmediği görülmüş, fakat ikisinin birlikte güçlü bir aktivasyon meydana getirdiği tespit edilmiştir (Gromada J ve ark., 1995; Weir G C ve ark., 1989). Glukoz ve GLP-1 etkileşimleri, β-hücrelerinin adenozin trifosfat kanalları seviyesinde olabilir. Bu kanallar, hücre içi KATP (ATP ye hassas potasyum kanalı) seviyelerine duyarlıdır böylece β -hücrelerini glukoz metabolizmasına duyarlı hale getirir ve aynı zamanda GLP-1 tarafından aktive olmuş protein kinaz A tarafından etkilenebilir (Gromada J ve ark., 1998; Gutniak M K ve ark.,1996). Her durumda KAPT kanalına bağlanıp onun kapanmasını sağlayıp böylece kalsiyum girişine neden olan sülfonilüreaz, GLP-1'in glukoza olan bağımlılığını çözer ve bu şekilde elde edilen potansiyel klinik açıdan önem taşımaktadır (MacDonald P E, 2002). Bu insülinotropik eylemlerinin yanı sıra, GLP-1'in diğer etkileri onu tip 2 diyabet tedavisi için son derece cazip hale getirmiştir. Yapılan çalışmalarda ilk olarak, GLP-1 sadece yüksek kan glukoz seviyelerinde (>250 mg/dl) insülin salgısını arttırdığı gözlenmiştir (Nathan D M, 1992). GLP-1, glukoz ile uyarılmış olan insülin salgılanmasını güçlendirir ama uyarılmamış insülini etkilemez böylece hipoglisemiye sebep olmaz. Buna ek olarak GLP-1, insülinin sadece gen transkripsiyonunu

değil insülin biyosentezinin tüm adımlarını uyarır (Fehmann H C ve ark., 1992). Bu nedenle insülin salgılanmasında rol alan hücresel genlerin çoğalmasını sağlar (Buteau J, 1999). Ayrıca yetersiz β-hücresi olan bireylerde yeni hücreler sağlama yeteneğine sahip olduğu için β-hücre proliferasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Perfetti R, 2000; Staffers D A ve ark., 2000). Son zamanlarda GLP-1 reseptör sinyali sayesinde β-hücre apoptozunda azalma saptanmıştır ki bu β-hücre kitlesinin artmasına da katkısı vardır (Wang Q ve ark., 2004; Johnson J D ve ark., 2004). Üçüncüsü ise GLP-1 güçlü bir şekilde glukagon sekresyonunu inhibe eder ve bu sekresyon inhibisyonu da glukoz bağımlıdır (Nauck M A ve ark., 2002). Herhangi bir şekilde artık β- hücresi salgılama kapasitesi olmayan diyabetik hastalarda GLP-1 infüzyonu yapıldığında glukagon sekresyonu inhibe olduğu için GLP-1'in glukoz düşürücü rol oynadığı görülmüştür (Creutzfelt W, 1996). GLP-1'in diğer özelliklerinden gastrointestinal motilite üzerine özellikle gastrik boşalmanın inhibisyonunda rol aldığı söylenebilir (Nauck M A ve ark., 1997). Gastrik boşalmanın yavaş olması diyabetik hastalarda çok önemlidir çünkü bu etki glukoz seviyesinin tokluk artışını kısmen durdurabilir. Bütün bu etkileri göz önünde bulundurursak GLP-1 ve veya etki mekanizması yolakları, tip 2 diyabet için çok umut verici bir tedavi imkânı olarak görülür.

2.4.2. GLP-1'in Etkilerinin Kısıtlamaları

GLP-1'in bütün etkilerine rağmen onun tedavideki yararlılığını sınırlandıran bir sorun vardır. Terapötik bir madde olarak GLP-1'in kullanımı için en büyük dezavantaj hızlı bozulma nedeniyle meydana gelen son derece kısa yarı ömür sorunudur. Başlangıçta hızlı bozulmasının sebebi her yerde bulunan ve ekspresse olan dipeptidil peptidaz 4 (DPP-4) nedeniyledir (Deacon C F, 1995). Biyolojik açıdan aktif bir GLP-1'in yarı ömrü 1-2 dakikadır (Kieffer T J ve ark., 1999). Yemek sonrasında serbest bırakılan GLP-1'in yarısından daha fazlası kesilmiş metabolit olarak sirküle edilmektedir. GLP-1'in cilt altı enjeksiyonundan sonra bakıldığında 30-60 dakika içinde konsantrasyon pikine ulaşır ve 1-2 saat içinde yıkılır (Drucker D J, 2001). Bu ekzojen GLP-1 in çoğunlukla kesik metabolit olarak dolaşımda bulunduğu anlamındadır.

2.4.3. GLP-1'in Klinikte Kullanımı

Araştırmalar GLP-1'in intravenöz infüzyonu tip 2 diyabeti olan hastalarda kan şekerini tamamen normalize ettiğini göstermiştir (Nauck M, 1993). Sürekli intravenüz infüzyon rutin tatbikat için uygun değildir bu yüzden araştırmacılar rutin kullanım için çeşitli yolları

denemişler ve bu denemeler GLP-1'in etkinliğini göstermiştir. GLP-1'in bozulmasını geciktirmek için en uygun enjekte olabilecek formu geliştirilmiş ancak; çeşitli yöntemler kullanılarak elde edilen sonuçlar GLP-1'in tip 2 diyabet hastaları için tedavi amaçlı kullanıldığında bozulma öncesi döneminin hala çok kısa olduğunu göstermiştir (Pridal L, 1996). Bu nedenle birden fazla enjeksiyon GLP-1'in tedavi için kullanımında gereklidir. Birçok pratik sorunun hala çözülmesi gerekmesine rağmen GLP-1 tabanlı bir tedavi tip 2 diyabet tedavisi için en önemli ümit verici yaklaşımlardan biri olacağı düşünülmektedir. Tedavi edici madde olarak GLP-1'in kullanımını daha etkin hale getirmek için araştırmalar devam etmektedir.

GLP-1'in son derece kısa ömürlü olması nedeniyle DPP-4, dayanıklı analoglara alternatif olarak geliştirildi (Deacon C F, 1997). Bu analoglar, doğal GLP-1 ile karşılaştırıldığında daha uzun bir süre insülinotropik etkilerini muhafaza edebildikleri görülmüştür. İlginç bir analog olan eksendin-4 (exendin4) 39 aminoasitlik bir peptidtir ve kertenkele zehirinden izole edilmiştir. Bu analog ile GLP-1 % 5 dizi benzerliğine sahiptir. Eksendin-4, GLP-1 reseptörü için tam bir agonisttir ve DPP-4 aksiyonlarına karşı direnç gösterdiği gösterilmiştir (Thorens B ve ark., 1993).

Diyabetik hastalarda eksendin-4 tedavisi ile ilgili çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmalar analoğun kan şekerini ve hemoglobin değerlerini normalleştirdiği, hemoglobin değerlerini normale yakın tuttuğu (Greig N H ve ark., 1997), tip 2 diyabet hayvan maddelerinde vücut ağırlığını azalttığı (Young A A ve ark., 1999), yağlı karaciğer farelerinde ise glisemi, hiperinsülinemi ve vücut ağırlığını iyileştirdiği (Szayna M ve ark., 2000) göstermiştir. İnsan çalışmalarında ise tip 2 diyabet hastalarının bu analog ile tedavisinde glukoz düzeylerini azalttığı (Egan J M ve ark., 2003) sülfonilure ve metformin kombinasyonu ile kullanıldığında yemek sonrası glukozu anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (Fineman M S ve ark., 2003). Ayrıca eksendin-4'ün iyi glisemik kontrolü olan kişilerde ve şeker hastalığı olan kişilerde eşit derecede etki ettiği ortaya çıkmıştır (Kolterman O G ve ark., 2003). Bir diğer analog olan NN2211 NovoNordisk tarafından geliştirilmiştir. Bu analog DPP-4 hassasiyetini düşürebilir ve aynı zamanda enjeksiyon yerindeki emilimini geciktirebilir (Juhl C B ve ark., 2002). NN2211'in akut veya sürekli uygulaması glukozu azaltır, insülin düzeylerini arttırır, glukagon salınmasını bastırır ve glukoz intoleransı olan modellerinde mide boşalmasını geciktirir (Riebel U ve ark., 2002; Degn K B ve ark., 2004).

Sonuç olarak eksendin-4 ve NN2211 gibi DPP-4 dayanıklı analogların tip 2 diyabeti olan hastalarda, GLP-1' in pozitif etki gösterdikleri ispat edilmiştir. Ama yine de terapotik etkiyi elde etmek için sık sık enjeksiyon gereklidir.

İkinci ana strateji ise, DPP-4'ü inaktive etmektir. Bu inhibitörlerin kullanılması tip 2 diyabet hastalarında GLP-1'in aşırı bozulması sonucu önerilmiştir (Holst J J, 1998). Daha sonra çok sayıda çalışma, DPP-4 inhibitörlerinin uygulanmasını diyabet geliştirme riski taşıyan olgulara sunulabileceğini göstermiştir. Oral olarak etkili bir çok DPP-4 inhibitörünün çeşitli hayvan modellerinde anti diyabetik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Balkan B ve ark., 1999; Pospisilik J A ve ark., 2002; Villhauer E B ve ark., 2002). Bu inhibitörlerin klinik çalışmaları da mevcuttur. Nispeten hafif hiperglisemisi olan tip 2 diyabet hastalarında ilaçlar ile tedavi mümkün değilken açlık plazma glukoz seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı ve tedavinin kabul edilebildiği gösterilmiştir (Ahren B ve ark., 2002). Tip 2 diyabet hastalarında tek doz yeterlilik çalışmalarında glukoz ve glukagon seviyelerinde düşüş ve GLP-1 seviyesinin arttığı gösterilmiştir ve bu yüzden bu inhibitörlerin bazıları Faz 3 klinik denemelerini aşmıştır (Ahren B ve ark., 2004). Sonuç olarak DPP-4 inhibitörü ile tedavi belirgin olarak gün boyunca glukoz seviyelerini azaltmaktadır. DPP-4 inhibitörlerinin kullanılması avantajlıdır; çünkü yan etkisi yoktur ve oral olarak kullanımı mümkündür. Ancak DPP-4 inhibisyonu uzun vadeli etkisi olup olmayacağı belirsizdir. DPP-4 çok sayıda düzenleyici peptidi metabolize ettiğinden, inhibitörlerin etkisi tamamen GLP-1'e atfedilecek diye bir garanti yoktur. Örnek olarak bir bağırsak büyüme faktörü olan GLP-1-2 nin de DPP-4 sübstratı olduğu bilindiğinden bu inhibitörlerin intestinal çoğalma üzerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir (Holst J J, 1998).

2.5. GLP-1 Reseptörü

2.5.1. Giriş

İlk olarak 1992'de Dr. Thorens tarafından kullanılmış olan GLP-1R (GLP-1 reseptörü) 463 aminoasitten oluşan bir proteindir (Thorens B, 1992). GLP-1R bir sınıf B (class B) G protein kenetli reseptör (G-protein coupled reseptör, GPCR) olup GIP ve glukagon reseptörü ile aynı ailede yer almaktadır (Runge S ve ark., 2010). Bu reseptör, bir N-terminal hücre dışı ligand bağlama alanı dahil olmak üzere yedi transmembran domainden oluşmaktadır (Runge S ve ark., 2010; Gupta N A ve ark., 2010). Sekretin

reseptör ailesi olarak bilinen bu ailede, reseptörlerin genellikle üç hücre dışı döngüsü bir N-terminal hücre dışı etki alanı ve bir hücre içi karboksil terminali (C- terminal) vardır (Runge S ve ark., 2010). Bu reseptör ailesi adenilat siklaz uyarıcı G protein yoluyla birleşerek siklik AMP(cAMP) konsantrasyonunu hücre içinde düzenleyebilme kabiliyetleri ile tanınmaktadır (Madsbad S ve ark., 2008).

GLP-1R, türler arasındaki dizisini yüksek derecede korumaktadır. Örneğin insan GLP-1R ve fare GLP-1R % 90 dizi benzerliği göstermektedir. GLP-1R, GLP-1 için de oldukça spesifiktir (Madsbad S ve ark., 2008; Brubaker P L ve ark., 2002). Türler arasında bakıldığında reseptörün dokulardaki dağılımında farklılıklar olduğu görülmüştür. Çalışmalar köpeklerdeki doku dağılımının insan ve faredekinden çok daha farklı olduğunu göstermiştir (Sandhu H ve ark., 1999). İlk insan çalışmaları, insanlardaki GLP-1 reseptör dağılımının hipotalamus, pankreas β-hücreleri, akciğer ve midede olduğunu göstermiştir (Sandhu H ve ark., 1999; Harmar A J, 2001).

2.5.2. GLP-1R Aktivasyonu

GLP-1, GLP-1R'in çözünebilir hücre dışı domaini ile bağlantı kurmaktadır ve bu özel kristal yapı kompleks oldukları zaman özel olarak meydana çıkmaktadır (Underwood C R ve ark., 2010).

Esas olarak GLP-1, C-terminali vasıtası ile reseptöre bağlanır. GLP-1'in C-terminalinde uyum değişikliği, bağlanmadan önce rastgele dağılan N-terminal kalıntılarını kapsadığı düşünülmektedir. Allosterik etki sonucu helezon form oluşur ve GLP-1R'nin hücre-dışı etki alanındaki N-terminal kalıntılarının doğru konumlanmasından sonra reseptör aktive olur (Underwood C R ve ark., 2010).

2.5.3. GLP-1R Sinyal Mekanizması

GLP-1R, sindirim sistemi, beyin, kalp, böbrek ve pankreas dokularında bulunmaktadır (Bullock B P ve ark., 1996; Campos R V ve ark., 1994). GLP-1'in reseptöre bağlanması sonucunda G-protein aracılığı ile adenilat siklaz aktive olur ve hücrede cAMP seviyeleri artar.

Protein kinaz A ve cAMP vasıtası ile düzenlenen guanin nükleotid değişim faktörü (cAMP-GEF11 veya Epac2) yüksek cAMP seviyeleri ile uyarılır. Daha sonra hücre içinde kalsiyum

konsantrasyonları iyon kanallarının aktivasyon değişikliğinden dolayı artar. Sonuç olarak bu değişiklikler insülin salgılayan granül etkileyip onların β-hücrelerinden taşınmasını sağlar (Kim J G ve ark., 2003).

cAMP' nin yükselmiş düzeyi cAMP'ye yanıt veren bağlanma proteini (cAMP'ye yanıt veren bağlanma proteini, CREB), P13K yolağını aktive ederek hücrenin hayatta kalmasını sağlar ve β-hücrelerinin çoğalması üzerinde etkisi vardır (Drucker D J ve ark., 2006; Brubaker P L ve ark., 2004).

2.5.4. GLP-1 ve GLP-1R Genetik Bakış

GLP-1, preproglukagon tarafından kodlanmaktadır ve bu büyük genin 7 ile 37inci kodonları arasını oluşturmaktadır (Holz G G ve ark., 1993).

Gen yapısı: Araştırmacılar, insan glukagon geninin yaklaşık olarak 9.4 kb uzunluğunda olduğunu ve 6 ekzon ve 5 intron içerdiğini göstermişlerdir (White J W ve ark., 1986). DNA probu kullanarak glukagonu ikinci kromozoma tahsis etmişlerdir (Tricoli J V ve ark., 1984). Ayrıca insitu hibridizasyon için bir DNA probu kullanarak gen 2q36-2q37'ye lokalize edilmiştir (Schroeder W T ve ark., 1984). Fare de ise glukagonun kromozom iki üzerinde olduğu bulunmuştur (Lalley P A ve ark., 1987).

GLP-1R: GLP-1R genine bakıldığında sadece sekretin (SCTR) kalsitotin(CALCR) ve paratiroid hormonu (PTHR) için olan reseptörler arasında benzerlik bulunmuştur ki bu reseptörler G-protein birleştirilmiş alıcılar ailesini oluşturmaktadır. Bilim insanları ayrıca GLP-1R genine karşılık gelen bir cDNA (komplementer DNA) klonlamışlardır (Dillon J S ve ark., 1993).

Araştırmacılar, flöresan in situ hibridizasyon yöntemini kullanarak GLP-1R genini 6p21 bölgesine lokalize etmişlerdir (Stoffel M ve ark., 1993). GLP-1R geni on üç ekzondan oluşan bir gendir (Tokuyama Y ve ark. 2004). Kershaw ve ark. , fare GLP-1 reseptörünün kromozom 17 üstünde major histocompatibility bölgesine (MHC) haritalandığını rapor etmiştir (Kershaw E E ve ark., 1995).

GLP-1R polimorfizm: GLP-1'in biyolojik eylemlerini GLP-1R aracılığı ile yapması açıktır (Huang G ve ark., 2012). Glukoz toleransı için GLP-1R'nin önemi knockout farelerde ispatlanmıştır. Bu farelerde, düşük insülin salgılanması ile bağlantılı olarak oral glukoz problemine anormal glukoz tepkisi ortaya çıkmıştır. Bu durum, tip 2 diyabette inkretin tedavisinin başarılı olmasının temelidir (Ahlkvist L ve ark., 2013). Obezite ve T2DM

hastaları, yetersiz tedavi seçenekleri ile birlikte yaygınlığı artan bir ivme göstermektedir. GLP-1R'nin inkretin eylemleri şu an T2DM tedavisi için kullanılmaktadır. GLP-1 sisteminin bu tedavilerle etkin hale gelmesi iştahı bastırır ve enerji harcamasını arttırır ve bu ikisi başarılı bir şekilde obezite tedavisinin önemli bileşenlerinden biri olma yönünde umut vermektedir (Lockie S H, 2013).

Terapotik GLP-1 sistemini hedeflemek için iki yol vardır: DPP-4 inhibisyonu ya da GLP-1 reseptörünün doğrudan uyarılması. Bu iki yönteme bakıldığında da GLP-1R agonistlerinin uzun etkili versiyonları glisemik kontrol için daha iyi sonuçlar sunmaktadır (Deacon C F ve ark., 2012). GLP-1R'nin tokluk hissi verici ve kan glukoz düzeylerinin düzenlenmesinde etkileri görülmüştür. Bu nedenle beslenme davranışı üzerinden, GLP-1R'in önemli bir fizyolojik gen olduğunu ortaya konmaktadır (Drucker D J, 2002; Kumar K G ve ark., 2006). GLP-1R'nin ifade edilişinde genetik varyasyonlar, farelerde mide boşalma hızını etkilediği görülmüş ve midede allele özel GLP-1 ekspresyonun gastrik boşalma hızını etkilediği bulunmuştur. Ayrıca çalışmada GLP-1 reseptörünün blokajı, işlevsel bir polimorfizm olduğunu bile ortaya koymuştur. Genetik polimorfizmlerin geniş varyasyonlarının bireysel ilaç yanıtlarına etkileri olabilir. Gelişmekte olan farmakogenetik alanında ilaç metabolizmasının ve hasta yanıtını tahmin etmek için genetik varyasyonların saptanması amaçlanmaktadır (Kumar K G, 2007).

Bu konu ile ilgili çalışmalara baktığımızda GLP-1R genetik varyasyonların, in vivo olarak GLP-1'e yanıtı değiştirebileceği düşünülmektedir (Sathananthan A, 2010). Buna ek olarak doğal olarak meydana gelen tek nükleotid polimorfizm (SNP)'lerin varlığı, terapotik amaçlı kullanılan ilaçlara olan tepkiyi de değiştirebilir. Reseptör hedefli tedavilerde, SNP'lerin varlığı tedavi etkinliğini etkileyebilmesi olası bir mekanizmadır. Çoğu G-proteine bağlı reseptörün SNP'leri detaylı olarak araştırılıp karakterize olmasına rağmen GLP-1R SNP'leri ile ilgili bilgi kısıtlıdır (Koole C, 2011). Bu konu ile ilgili son olarak Tokuyama ve arkadaşlarının ortaya koyduğu bir çalışma vardır.

Bu çalışmadan önce GLP-1R gen polimorfizmleri için mikrosatelitler kullanılarak bağlantı analizleri yapılmış ve sonuçlara göre GLP-1R geninin mutasyonları farklı ırk gruplarından tip 2 diyabet mellitusun patogenezinde önemli olmadığı ortaya konulmuştur (Tanizawa A C ve ark., 1994; Zhang Y ve ark., 1994). Ancak GLP-1genindeki SNP'ler için bir örneklem çalışması yapılmamıştır.

Tokoyama ve arkadaşlarının raporu, GLP-1R genindeki SNP ler için sistemik aramanın sonucunu ortaya koyan ilk rapordur. Otuz altı tip 2 diyabet hastalığı olan olgu, GLP-1R geni tüm gen dizi analizi ile incelendiğinde 5 yanlış anlam ve 4 sessiz mutasyon saptanmıştır (Tokuyama Y ve ark., 2004).

GLP-1'in obezite için farmakolojik tedavide uygulanması henüz rutin kullanımda olmayan bir aşamadadır (Nauck M A, 1996; Drucker D J, 2001; Bloomgarden, 2002). GLP-1R polimorfizmleri, GLP-1 ile ilgili maddelerin farmakolojik etkilerini değiştirebilir ve bu polimorfizmler diyabetin patogenezinde bir faktör olabilir. Bu yüzden GLP-1R polimorfizmlerinin fonksiyonel analizinin yapılmasının, olguların ilaç faydalanma oranlarının arttırılması için fayda sağlayabileceğine ve obezitenin gelişimindeki mekanizmaların aydınlatılmasında yol gösterici katkısı olabileceğini düşünmekteyiz.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

Bu araştırma, tanımlayıcı kesitsel nitelikte bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Bu araştırma, Temmuz 2013 - Eylül 2014 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve DEGETAM (Dokuz Eylül Genetik Tanı Merkezi) Moleküler Genetik Laboratuvarları'nda yapıldı.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi / Çalışma Grupları:

Bu çalışmaya dahil edilen periferik kan örnekleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji ve Metabolizma Bilim Dalı'nda obezite tanısı almış yüz altmış iki hastadan toplandı. Çalışmaya alınan çocukların ebeveynlerine çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verildi ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formları alındı.

Bu çalışma, "GLP-1 Reseptör Polimorfizmlerinin Obeziteye Olan Etkilerinin Araştırılması" adlı BAP projesi (2013.KB. SAG.241) kapsamında yapıldı.

3.4. Çalışma Materyali:

Çalışmaya katılan her çocuktan etilen diamin tetra asetik asitli (EDTA'lı) tüplere 2'şer ml periferik kan örneği alındı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

Bu araştırmanın değişkenleri, gendeki varyasyonlara göre, obeziteli bireylerde yağlı karaciğer görülme sıklığıdır.

Bağımlı değişken: Yağlı karaciğer hastalığı, Boy, Kilo, VKI, Boya göre ağırlık, Cinsiyet
Bağımsız değişken: GLP-1 reseptör polimorfizmleri

3.6. Veri Toplama Araçları:

3.6.1. Bilgi Toplama:

Araştırmaya dâhil olan olguların klinik bilgileri, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Metabolizma ve Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndaki kayıtlarından elde edildi.

Tüm hastaların klinik verileri oluşturulan hasta veri toplama formuna kaydedildi. Hastaların antropometrik verileri, yağlı karaciğer varlığı ve polimorfizm varlığı kaydedildi.

3.6.2. Kullanılan Cihazlar:

Araştırmada kullanılan aletler ve markaları tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Araştırmada kullanılan aletler ve markaları

Alet	Marka
Pipet seti	Finnipipette
Nanodrop	ND-1000 Spectrophotometer Nanodrop
Yatay elektroforez cihazı ve güç kaynağı	Hybaid
Vorteks	IKA Ms-3
Termal cycler	Eppendorf
-20 derece dondurucu	Altus
+4 derece buzdolabı	Altus
Sekans cihazı	Applied Biosystems
Isı bloğu	P.Selecta
Steril kabin	Thermo
Santrifüj cihazı	Eppendorf
Hassas terazi	Denver

3.6.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler:

Araştırmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler Tablo 2 ‘de verilmiştir.

Tablo 2. Araştırmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasal madde ve sarf malzeme	Marka	Lot numara
DNA izolasyon kiti	Roche	11796828001
Primer çiftleri	Metabion	9634A04-9634B04-9634C04-9634D04-9634E04-9634F04
Orange G boya	Sigma	84H2502
Agaroz	Sigma	12K00011
TBE	Applichem	5D004086
Big dye kiti	Applied Biosystem	1109324
Purifikasyon kiti	ZRDNA Sequencing Cleaning	ZRC176334
Ready-2x-multiplex	Nanohelix	NIM0138
Tune up	Nanohelix	TUS1751M

3.6.4. Araştırmanın Yöntemi:

Alınan kan örneklerinden özel DNA izolasyon kitleri vasıtasıyla DNA elde edildi ve elde edilen DNA’lardan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemi gerçekleştirildi. PZR ürünleri agaroz jelde yürütülerek istediğimiz bölgelerin amplifikasyonunun olup olmadığı kontrol edildi. Daha sonra, bu PZR ürünlerinden ***Sanger*** metodu ile dizi analizi işlemi gerçekleştirildi. Kapiller elektroforez cihazında yürüyen örneklerin analizleri uygun yazılımlar yardımıyla yapıldı.

3.6.4.1. Olgu Gurupların Belirlenmesi Ve Örnek Alımı:

Çalışmaya Temmuz 2013 - Mayıs 2014 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Gastroenteroloji ve Beslenme-Metabolizma polikliniğine kilo fazlalığı yakınması ile başvuran ve antropometrik verilerine göre obezite tanısı alan, 10-18 yaş arası hastalar alındı. Endokrinolojik (Cushing Sendromu, büyüme hormonu eksikliği, tip 1 diyabet ve hipotiroidi), genetik (Prader-Willi sendromu, Down sendromu vb) nedenler ile kronik ilaç kullanımı öyküsü (steroid, antidiyabetik) olan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Tüm hastaların fizik incelemeleri ve antropometrik ölçümleri yapıldı. Hastaların hesaplanan VKİ'leri, aynı cinsteki çocukların VKİ persentilleri ile karşılaştırıldı ve 95 persentilin üzerinde olanlar obez olarak kabul edildi (Cole T J, 2012).

İnsülin direnci homeostaz modeli değerlendirilmesi (HOMA-IR= Homeostasis Model Asessment) diyabetik olan ve olmayan kişilerde, kişide ölçülen glukoz ve insülin değerleri kullanılarak beta hücre fonksiyonunu ve insülin direncini pratik bir şekilde inceleme imkânı sağlayan bir modeldir (Mathews D R, 1985). HOMA-IR "açlık insülin değeri (µIU/mL) x açlık glukoz değeri (mg/dL) / 405" formülü ile hesaplanır; değerin 2,5'in üzerinde olması prepubertal çocuklar için 4'ün üzerinde olması ise pubertedeki çocuklar için insülin direncinin varlığını işaret eder (Valerio G, 2006). Kandaki insülin değerleri Dokuz Eylul Hastanesinin merkez laboratuvarında, kemülüminesans yöntemini kullanan Beckman Coulter unicel DxI 800 cihazından yararlanılarak hesaplandı.

Obezite tanısı alan tüm hastalara yağlı karaciğer hastalığı varlığını tespit etmek için batın ultrasonografisi (USG) rutin olarak yapıldı. Ayrıca, yine obezite tanısı alan tüm hastalardan açlık kan şekeri, serum insülin düzeyi, lipid profili, karaciğer fonksiyon testleri, tam kan sayımı, tiroid fonksiyon testleri bakıldı. Karaciğer enzimlerinde bozulma ve/veya USG ile yağlı karaciğer hastalığı saptanan tüm hastalardan enfeksiyoz, metabolik ve otoimmun kaynaklı karaciğer patolojilerini dışlamak amacı ile serolojik ve biyokimyasal incelemeler rutin olarak yapıldı.

Ultrasonografi sonuçlarına göre hastalar yağlı karaciğeri olan ve yağlı karaciğeri olmayan obez hastalar olmak üzere iki gruba ayrıldı. Hasta ve ebeveynlerine sözlü ve yazılı bilgi

verildikten ve onamları alındıktan sonra, hastaların rutin biyokimyasal tetkikleri ve tam kan sayımı için kan alınırken, genetik çalışma için de K_2-EDTA'lı tüpe 1 mL kan alındı.

3.6.4.2. Kan Örneklerinden DNA Eldesi ve Kalite Kontrolü:

3.6.4.2.1. Kandan DNA İzolasyonu:

EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu *High Pure PZR Template Preparation Kit*'i (*Roche)* kullanılarak yapıldı.

Tablo 3. Kandan DNA izolasyonu için gerekli alet ve kimyasal listesi

Eppendorf tüpleri
Proteinaz K
Solüsyonlar (Wash buffer, Binding buffer, Elution buffer)
Otomatik pipetler (1-10 mikrolitre, 10-100 mikrolitre ve 100-1000 mikrolitre)
Steril pipet uçları (10, 20, 100, 200 ve 1000 mikrolitrelik)
Vorteks (*IKA MS 3 basic mini vorteks*)
Santrifüj (*Centrifuge 5415D Eppendorf*)
Steril eldiven

DNA izolasyonları aşağıda belirtilen protokole uygun olarak gerçekleştirildi (Tablo 3). Finalde her örneğe ait 100 mikrolitre DNA elde edildi ve DNA'lar -20°C'de saklandı.

1. 200 µl kan üzerine 200 µl bağlanma solüsyonu (*binding buffer*) ve 40 µl Proteinaz K eklendi ve karıştırıldı.
2. Isı bloğunda 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.
3. Üzerine 100 µl izopropanol eklendi, pipetaj ile karıştırıldı, filtreye alındı.
4. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Altta kalan kısım uzaklaştırıldı ve 500 µl *removal buffer* eklendi.
6. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Altta kalan kısım uzaklaştırıldı ve 500 µl *wash buffer* eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
8. 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. 100 µl *elution buffer* üzerine eklendi.
10. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

3.6.4.2.2. DNA'ların Nanodrop ile Ölçümü:

Elde edilen DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı *ND–1000 Spectrophotometer Nanodrop* cihazı kullanılarak ölçüldü (ng/ml). Spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarındaki okumalar oranı DNA'nın saflığını verir. Bu oranın 1.8 olması DNA'nın saflığı, daha düşük olması RNA kontaminasyonu, Daha yüksek olması ise protein kontminasyonunu gösterir (Maniatis T ve ark., 1982) .Konsantrasyonu yeterli olmayan ve saflığı iyi olmayan DNA'lar, periferik kandan tekrar izole edildi.

3.6.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):

3.6.4.3.1. PZR İçin Primerlerin Tasarlanması:

GLP-1R geni 2, 4 ve 5. ekzon bölgelerini polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltmak için bu bölgelere özel primerler dizayn edildi. Primer dizaynında, *NCBI Primer Blast* primer dizayn programı (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) kullanıldı. Primerler 0,2 µM konsantrasyonda liyofilize şekilde *Metabion Gmbh* (*Germany*) firmasına sentezletildi (Tablo 4).

Tablo 4. GLP-1R geni ekzon 2, 4 ve 5 primerleri

Ekzon 2	*Forward*	5'-catcaaagtcctccagaagttg-3'
	Reverse	5'- cagaatttggggctttgaggtt-3'
Ekzon 4	*Forward*	5'-cagtgaagtgctccaagacatg-3'
	Reverse	5'-cagcgtatatgtcaggggagg-3'
Ekzon 5	*Forward*	5'-ctgcttcattcctctatctggg-3'
	Reverse	5'-tgtattcacctctctggccttg-3'

3.6.4.3.2. Primerlerin sulandırılması:

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarlarda distile su eklenerek 100 pikomol/µl'lik stok çözeltiler hazırlandı. PZR işleminde kullanılmak üzere stoktan 10 pikomol/µl'lik konsantrasyonlu 100 µl'lik sulandırılmış primerler hazırlandı.

3.6.4.3.3. **DNA amplifikasyonu:**

Kandan elde edilen genomik DNA'nın çoğaltılması için PZR tekniği kullanıldı. PZR, 0,2 ml'lik steril reaksiyon tüplerinde gerçekleştirildi. DNA amplifikasyonu için gerekli malzemeler listesi, izlenen PZR protokolü ve PZR programı Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 5. DNA amplifikasyonu için gerekli alet ve kimyasallar listesi

Termal cycler (*Eppendorf Mastercycle*)
Otomatik pipetler (1-10 µl ve 10-100 µl)
Steril pipet uçları (10 µl, 100 µl, 200 µl'lik)
0,5 µl'lik ve 1,5 µl'lik eppendorf tüpleri (*Axygen*)
Eppendorf tüp taşıyıcıları
0,2'lik PZR tüpleri (*Axygen*)
Steril kavanozlar
Steril eldivenler
Buz kalıbı
Deiyonize su
PZR Reaksiyon Karışımı (*Nanohelix-Helix AMP Ready-2x-multiplex*)
PZR Güçlendirici (*Tune up* solüsyonu, *Nanohelix*)
Primerler

Tablo 6. PZR için hazırlanan karışım (örnek başına)

PZR *Ready mix*	15 µl
Distile su	2 µl
Tune up solüsyon	3 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
DNA	30 ng/ml olacak şekilde

Tablo 7. Kullanılan PZR programı

Etki	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
Denatürasyon	95 ^{0}C	15 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 ^{0}C	30 saniye	35 döngü
Bağlanma	57 ^{0}C	45 saniye	
Uzama	72 ^{0}C	45 saniye	
Final Uzama	72 ^{0}C	7 dakika	1 döngü

GLP-1R geninin üç ekzonu için aynı protokoller uygulandı. Amplifikasyon ürünleri PZR programı bittikten sonra +4 ^{0}C'de saklandı.

3.6.4.3.4. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrolü:

PZR işleminden sonra, elde edilen ürünlerin amplifiye olup olmadıklarının kontrolü jel elektroforez yöntemi ile yapıldı. PZR ürünleri, %3'lük agaroz jelde yürütüldü. Elektroforez kasetinin içine, PZR ürünlerini koyabileceğimiz kuyucukların oluşması için tanka özgü taraklar yerleştirildi. 100 ml'lik erler içine, 3 gr agaroz ve 100 ml 0,5X tris-borate-EDTA (TBE) konulup manyetik karıştırıcı ve ısıtıcıda çözündürüldü. Berrak görünüm sağlanınca, 16 µl etidyum bromür eklenip karıştırıldı ve hazırlanan tabağa döküldü. Jelin donması için beklendi. Jel donduktan sonra örnekler jele yüklenirken bir parça parafilm üzerine 4 µl *orange-G* ve 3 µl PZR ürünü karıştırılıp, jeldeki kuyucuklara yüklendi. Elde edilen PZR ürünlerinin doğru amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için, her jele marker yüklendi. 120 volt akımda 15-20 dakika yürütüldükten sonra jel görüntüleme sistemi ile incelendi. Amplifiye olmayan veya hatalı amplifiye olan örnekler için PZR aşaması tekrar edildi.

Tablo 8. Jel elektroforez için gerekli alet ve kimyasal listesi

Yatay elektroforez
Güç kaynağı
Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı (*IKAMAG*)
Erlenmeyer
Mezürler (50 ml, 100 ml, 500 ml)
pH metre
Hassas tartı
Pipetler (2ml, 1,5 ml, 10 ml)
Pens ve çeşitli boyutlarda cam şişeler
Agaroz (Sigma, A5093 Lot 51K01131)
Etidyum bromür (Sigma)
Orange G (Biological Industries Lot 204804)
DNA marker (O'Range Ruler 100bp DNA Ladder)
Deiyonize su

3.6.4.4. DNA Dizi Analizi (Sekans Analizi):

3.6.4.4.1. İlk Pürifikasyon:

Elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforez kontrolünden sonra, bağlanmayan dNTP ve primerlerin ortamdan uzaklaştırılması için ilk pürifikasyon [*Exo Sap-IT (GML, Wollerau Switzenland)*] uygulanmıştır. 5 µl PZR ürünü alınıp üzerine 2 µl *Exosap* eklendi. Enzimin inkübasyon sıcaklığı 37 ºC' de 30 dakika, enzimin dezaktivititasyonu 80 ºC de 15 dakika olarak ayarlandı.

3.6.4.4.2. İkinci amplifikasyon (Sekans amplifikasyonu):

Birinci pürifikasyon sonrasında ikinci amplifikasyon işlemi (*cycle sequencing PZR*) kite özgü protokolle yapıldı (Tablo 10).

Tablo 9. İkinci amplifikasyon için gerekli alet ve kimyasal listesi

Termal cycler (*Eppendorf Mastercycle*)
Otomatik pipetler (1-10 µl ve 10-100 µl)
Steril pipet uçları (10 µl, 100 µl, 200 µl'lik)
0,5 µl'lik ve 0,2 µl'lik eppendorf tüpleri (*Axygen*)
Eppendorf tüp taşıyıcıları
Steril kavanozlar
Steril eldivenler
Buz kalıbı
Deiyonize su
Big Dye Terminator (*Applied Biosystems USA, v3.1*)
Dye saving solüsyon
1x buffer
Primerler

Tablo 10. İkinci amplifikasyon için uygulanan protokol

Dye saving solüsyon	3 µl
1x buffer	2 µl
Distile su	2 µl
Big dye	1 µl
Primer (F veya R)	1 µl
PZR ürünü	1,5 µl

Her bir örnek için aynı protokol uygulandı ve Tablo 11'deki koşullar ile amplifiye edildi. Sonrasında, oluşan ürünler +4 ºC'de saklandı.

Tablo11. İkinci amplifikasyon için koşullar

Etki	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
Denatürasyon	96 ^{0}C	1 dakika	1 döngü
Denatürasyon	96 ^{0}C	10 saniye	25 döngü
Bağlanma	50 ^{0}C	5 saniye	
Uzama	60 ^{0}C	4 dakika	

3.6.4.4.3. İkinci Pürifikasyon:

İkinci amplifikasyon işleminden sonra, bağlanmayan floresan işaretli boyalar, artık tuzlar, dNTP, primer ve enzimlerin temizlenmesi için, aşağıda belirtilen protokol ile ikinci pürifikasyon (*Zymo Research, ZRDNA Sequencing Clean-Up Kit*) yapıldı.

1. PZR ürünü 220 µl *binding buffer* ile karıştırıldı ve *Zymo spin IB* filtresine yüklendi.
2. 10000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
3. Üzerine 260-280 µl *wash buffer* eklendi.
4. 12600 rpm'de 40 saniye santrifüj edildi.
5. Filtre eppendorfa alındı.
6. Üzerine 15 µl distile su eklendi.
7. 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
8. Eppendorfta kalan ürün kapiller elektroforez cihazına yüklenmek üzere +4 ºC'de bekletildi.

3.6.4.4.4. PZR Ürünlerinin Cihaza Yüklenmesi:

Elde edilen saflaştırılmış PZR ürünleri, uygun kuyucuklara aktarıldı ve kapiller elektroforez cihazına (*Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer*) yüklendi.

3.6.4.4.5. Dizi Analizi:

Kapiller elektroforezde yürütülen örnekler, uygun analiz programları ile (*SeqScape v2,6; Applied Biosystems, USA*) "NC_000006 referans dizisi"ne göre analiz edildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi:

Plan	**Tarih**
Etil Kurul onayının alınması	25.04.2013
Projenin kabul edilmesi	22.01.2014
Hasta kanlarının toplanması	Temmuz 2013 - Mayıs 2014
Genetik çalışma	Temmuz 2013 – Eylül 2014
Tez yazımı ve proje raporunun tamamlanması	Eylül 2014 – Aralık 2014

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi:

GLP-1R geni ekzon 2, 4 ve 5'te incelenen varyasyonlar , SPSS 15 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*) istatistik programında yapıldı. Verilen ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. Grup oranlarının karşılaştırılmasında ki-kare testi, gözlerde beklenen değerler 5'in altında ise Fisher'in kesin ki-kare testi kullanıldı. İkiden fazla grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi, iki grup ortalamasının karşılaştırılmasında Student-t testi, gruplardaki değişkenler 30'un altında ise Mann-Whitney U-testi kullanıldı. $p<0.05$ bulunması anlamlı olarak kabul edildi. Ayrıca, risk hesaplaması yapılırken *Odds Ratio* (*OR*) değerleri kullanıldı.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları:

Çalışmamızın kısıtlı yönlerinden birisi hastalarda yağlı karaciğer hastalığı tanısının ultrasonografi ile konulmuş olmasıdır. Yağlı karaciğer hastalığının kesin tanısı karaciğer biyopsisi ile konulmaktadır. Ancak, rutin kullanım için invaziv bir yöntem olması nedeniyle tüm dünyada kilo fazlalığı ile başvuran çocukların yağlı karaciğer hastalığı açısından değerlendirilmesi batın ultrasonografisi ile yapılmaktadır. Ülkemizde GLP-1 reseptör gen polimorfizmini araştıran bir çalışma olmaması ve dünyada da bu konuda yapılmış olan çalışmaların sınırlı sayıda olması, bulgularımızın etnik farklılıklardan ne kadar etkilendiğinin yorumlanmasında kısıtlayıcı rol oynamaktadır. GLP-1 serum düzeyinin ölçülmemiş olması ise çalışmamızın başka sınırlılıklarından biridir.

3.10. Etik Kurul Onayı:

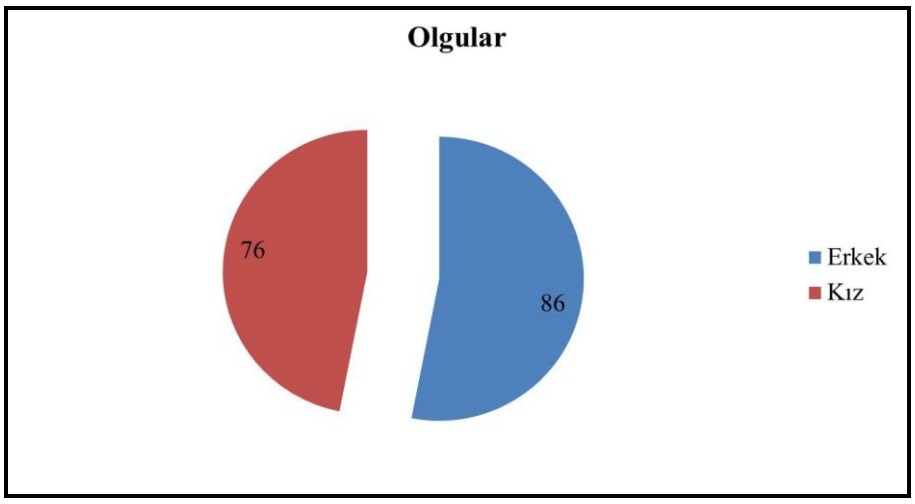
Dokuz Eylül Üniversitesi Etik kurulundan alınmış no: 2013/15-12 tarih: 25.04.2013 etik kurul onayı ile çalışma başlatılmıştır. (Ek 2)

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan hasta obez çocuk grubuna ait örneklerden elde edilen veriler değerlendirilmiş ve bulgular sunulmuştur.

4.1. Çalışma guruplarının oluşturulması:

Çalışmaya 10–18 yaş arası toplam 162 obez çocuk alındı. Bu çocukların ortalama yaşı 12,8 ± 2,1 yıldı. Olguların 86'sı (%53,1) erkek, 76'sı (%46,9) kızdı (Şekil 1). Çalışma grubunda olan olguların detaylı bilgileri Tablo 12.'de özetlenmiştir.

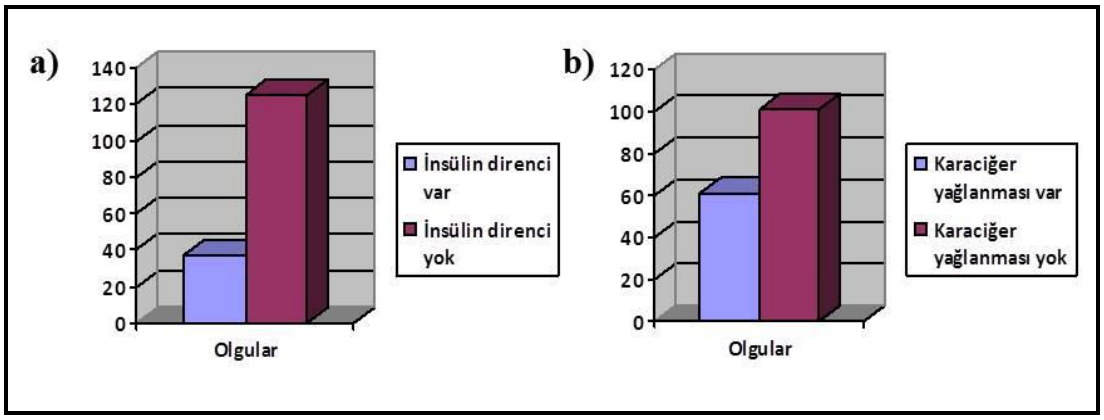


Şekil 1. Çalışma grubunun cinsiyet dağılımı

4.2. Olgulardaki insülin direnci ve yağlı karaciğer görülme sıklığı:

Çalışmaya alınan 162 çocuk olgunun boya göre ağırlık değerleri hesaplandı. Bu çocukların HOMA-IR değerlerine göre 37'sinde (%25,8) insülin direnci mevcuttu.

Çalışmaya alınan 162 obez çocuktan 61'inde (%37,6) karaciğer yağlanması olduğu saptandı (Şekil 2).



Şekil 2. a) Olgulardaki insülin direncinin dağılımı; b) olgulardaki karaciğer yağlanmasının dağılımı

Ayrıca olgularda, insülin direnci ve karaciğer yağlanması arasındaki ilişkiye bakıldı. Karaciğer yağlanması olan çocukların 20'sinde (%54,1) aynı zamanda insülin direnci olduğu gözlendi. Ayrıca yağlı karaciğer olmayan, ama insülin direnci olan 17 (%45,9) çocuk olgu vardı. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, yağlı karaciğer ve insülin direnci arasında anlamlı bir ilişki saptandı (*p=0,012*). Bunlara bakılarak yağlı karaciğer olmayan olgularda, insülin direncinin 2,6 kat daha az gözlendiği söylenebilir (Tablo 12).

Tablo 12. İnsülin direnci ve karaciğer yağlanması arasındaki ilişki

		İnsülin direnci				**Toplam**		**p**	**OR**	**%95 C.I.**	
		Yok		**Var**							
		n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**			**Alt Sınır**	**Üst Sınır**
Karaciğer Yağlanması	**Var**	33	31,1	20	54,1	53	37,1	**0,012**	0,384	0,179	0,827
	Yok	73	68,9	17	45,9	90	62,9				
	Toplam	106	100	37	100	143	100				

4.3. DNA izolasyonunun kontrolü:

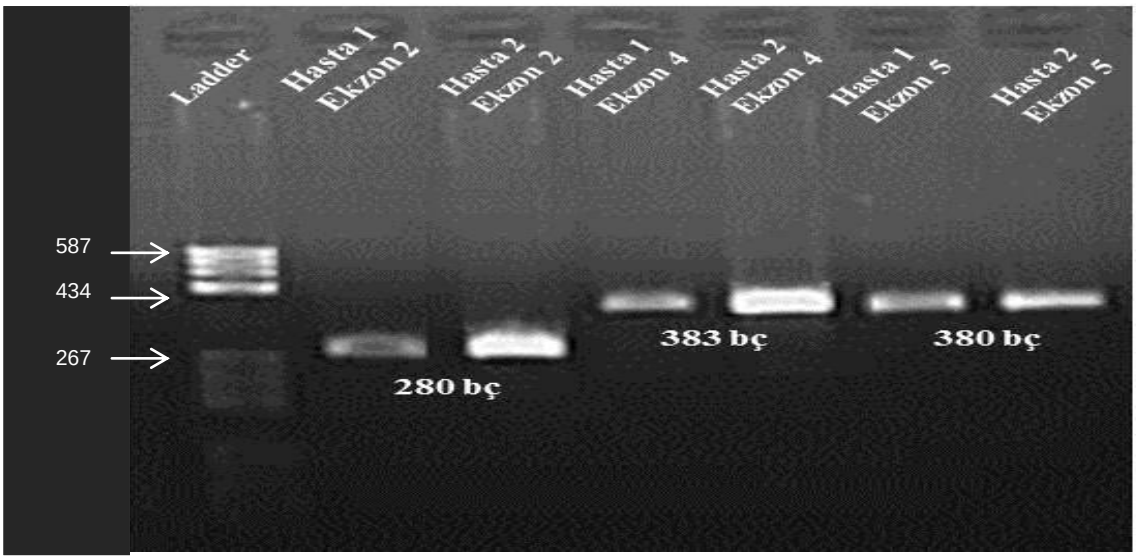
Çalışma grubundaki olgulardan EDTA'lı tüplere alınan iki mililitre kan örneklerinden izole edilen DNA'ların saflık değerleri ve konsantrasyonları *nanodrop* cihazı ile ölçüldü (Tablo13). Bunun dışında, tüm DNA örnekleri %3'lük agaroz jelde yürütülüp görüntülemeleri yapıldı.

Tablo 13. Olgulardan bazılarının DNA saflık değerleri ve konsantrasyonları

No	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Sabit Çarpan	Gösterge Pozisyon	Gösterge Absorbansı
1	35,57	0,711	0,404	1,76	1,89	50	230	0,376
3	17,87	0,357	0,222	1,61	1,01	50	230	0,355
4	26,58	0,532	0,257	2,06	2,05	50	230	0,259
7	34	0,68	0,349	1,95	1,9	50	230	0,358
11	84,56	1,691	0,904	1,87	1,93	50	230	0,874
19	24,33	0,487	0,191	2,54	1,03	50	230	0,473
20	38,85	0,777	0,374	2,08	1,78	50	230	0,437
29	52,52	1,05	0,557	1,89	1,92	50	230	0,547
37	18,95	0,379	0,137	2,77	2,04	50	230	0,186
38	19,94	0,399	0,204	1,95	1,04	50	230	0,383
39	19,02	0,38	0,194	1,97	1,56	50	230	0,243
40	19,29	0,386	0,232	1,66	1,33	50	230	0,289
41	56,85	1,137	0,649	1,75	1,76	50	230	0,647
45	26,88	0,538	0,303	1,78	1,16	50	230	0,463
50	60,5	1,21	0,645	1,88	2,06	50	230	0,587
51	83,47	1,669	0,884	1,89	2,25	50	230	0,741
53	45,77	0,915	0,505	1,81	1,29	50	230	0,71
54	23,22	0,464	0,212	2,2	1,82	50	260	0,464
63	91,94	1,839	0,973	1,89	1,87	50	230	0,985

4.4. PZR ve PZR ürünlerinin görüntülenmesi:

Elde edilen genomik DNA'lar PZR işlemi ile çoğaltıldı. Elde edilen PZR ürünlerinin, istediğimiz bölgelerin amplifikasyon ürünleri olup olmadığı ve doğru amplifikasyon gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü için, agaroz jel elektroforezi ile kontrolleri yapıldı (Şekil 3).



Şekil 3. Olguların GLP-1R geni ekzon 2, 4 ve 5'e ait amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. (DNA marker : O'Range Ruler 100bp DNA Ladder)

4.5. DNA dizi analizi:

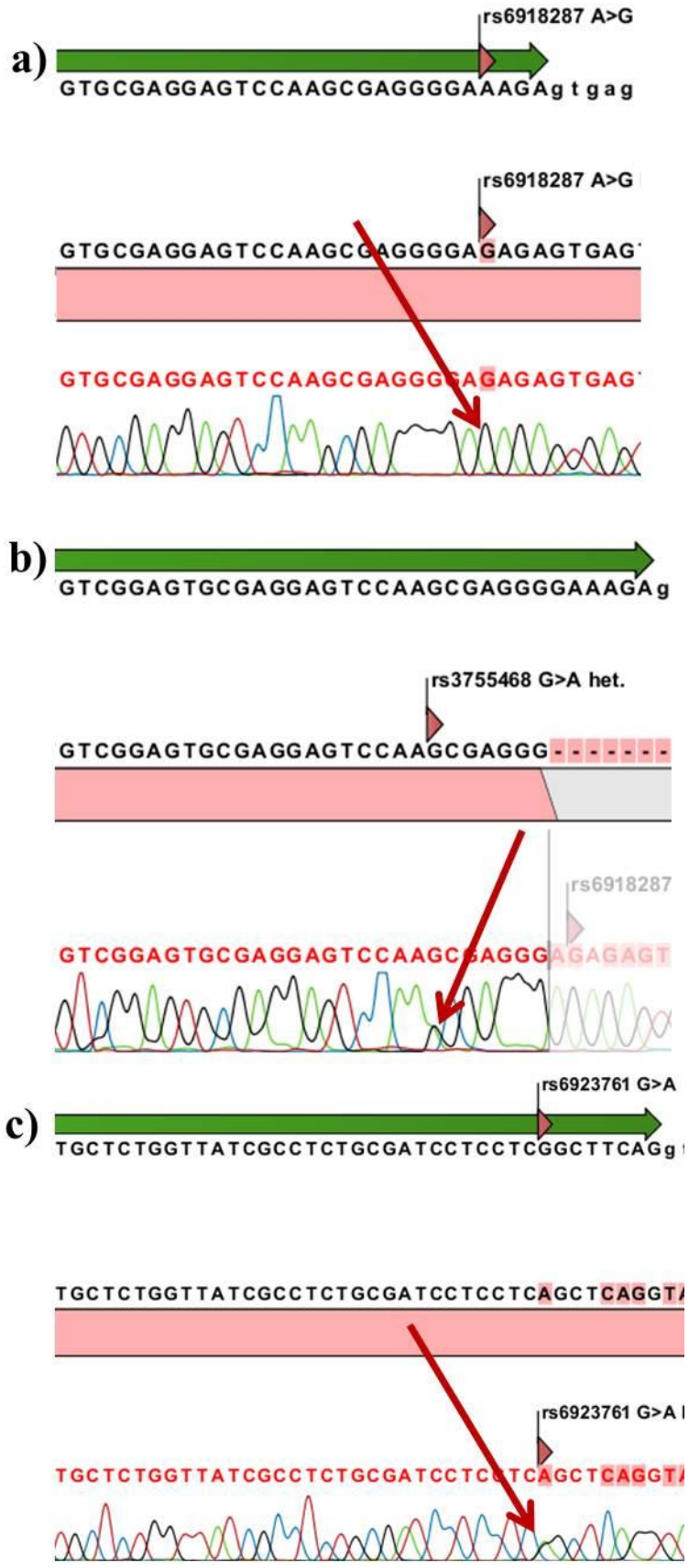
Nonspesifik bant içermeyen ve kontrolleri yapılan PZR ürünlerine saflaştırma işlemi ardından ikinci amplifikasyon PZR işlemi uygulandı. Ardından, ikinci saflaştırma işlemi uygulanıp, kapiller elektroforez cihazına yüklendi. Sonrasında uygun programlar yardımıyla analizler yapıldı.

4.6. Çalışmada saptanan mutasyonlar ve polimorfizmler:

Çalışmamızda, GLP-1R geni ekzon 2, 4, 5 ve ekzon-intron bileşkelerine dizi analizi yapıldı. Analizler sonucunda saptanan ekzon 4'te iki, ekzon 5'te bir polimorfizm ve ekzon 4'te bir mutasyon değerlendirmeye alındı (Tablo 14 ve Şekil 4).

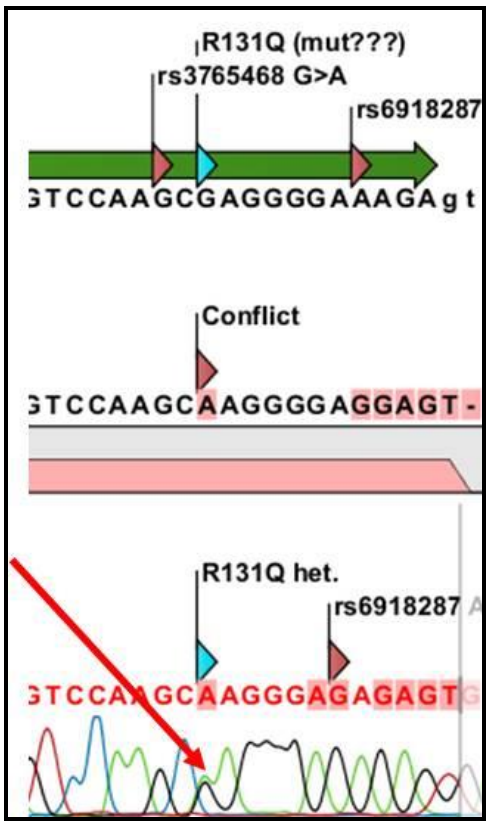
Tablo 14. GLP-1R geni ekzon 4 ve 5'te saptanan polimorfizmler ve olgulardaki genotip dağılımları

Polimorfizmler	Genotipler						Toplam
	Homozigot		Heterozigot		Yabanıl Tip		
	n	%	n	%	n	%	
rs6918287 (G>A)	1	0,6	10	6,2	151	93,2	162
rs3765468 (G>A)	3	1,9	32	19,7	127	78,4	162
rs6923761 (G>A)	13	8	58	36,0	91	56	162



Şekil 4. GLP-1R geni 4. ve 5. ekzonda saptanan polimorfizmlerin dizi analizi görüntüleri: a) rs6918287 homozigot; b) rs3765468 heterozigot; c) rs6923761 heterozigot

Ekzon 4'te saptanan R131Q değişimi (c.392G>A), literatürde mutasyon olarak tanımlanmıştı. Bu mutasyonda, komplementer DNA'nın 392. pozisyonundaki G nükleotidi yerine A nükleotidi geçmiş ve bunun sonucunda, 131. pozisyondaki CGC kodonunun CAC kodonuna dönüşmesiyle Arjinin aminoasidi yerine Glisin aminoasidi kodlanmıştı (Şekil 5).



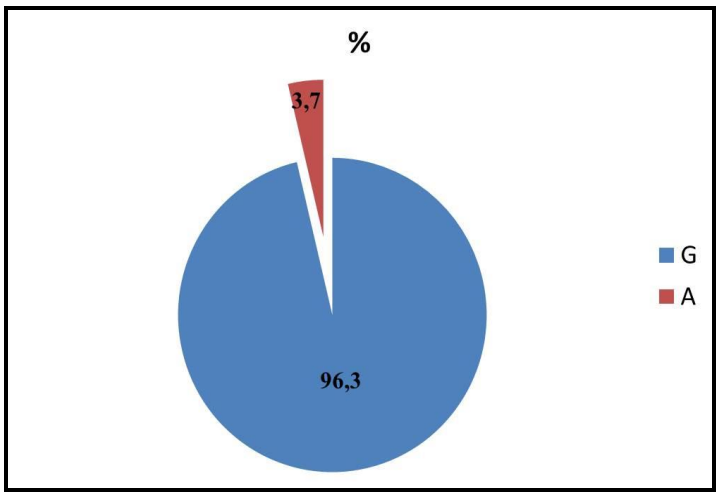
Şekil 5. GLP-1R geni 4. ekzonda saptanan heterozigot R131Q mutasyonu

4.7. rs6918287 (G>A) Polimorfizmi:

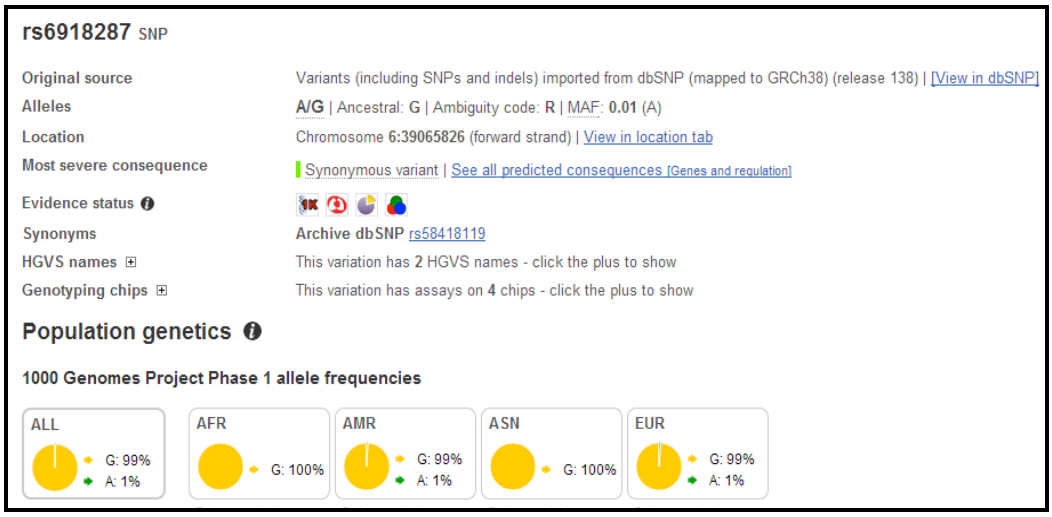
Obezitesi olan 162 olgunun 10'unda (%6,2) heterozigot, 1'inde (%0,6) ise homozigot rs6918287 (G>A) polimorfizmi saptandı (Tablo 15). Bu polimorfizm, GLP-1R geni 4. ekzonda bulunmaktaydı. Bu SNP'e ait G allel (normal allel) sıklığı %96,3, A allel sıklığı %3,7 olarak bulundu (Şekil 6). Bulunan değerler, veritabanlarında bulunan veriler ile benzerdi (Şekil 7) . Cinsiyet ile rs6918287 polimorfizminin genotiplerini karşılaştırdığımızda, anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 16).

Tablo 15. rs6918287 polimorfizmi genotip dağılımları

rs6918287	n	%
GG	151	93,2
GA	10	6,2
AA	1	0,6
Toplam	162	100



Şekil 6. rs6918287 polimorfizmi allel sıklıkları



Şekil 7. rs6918287 polimorfizminin popülasyon çalışmalarına göre allel sıklıkları

Tablo 16. Cinsiyet ve rs6918287 polimorfizmi genotipleri arasındaki ilişki

rs6918287	Cinsiyet				Toplam		p
	Erkek		Kız				
	n	%	n	%	n	%	
GG	79	91,9	72	94,7	151	93,2	0,574
AG	6	7	4	5,3	10	6,2	
AA	1	1,2	0	0	1	0,6	
Toplam	86	100	76	100	162	100	

Obezitenin derecesini belirleyen faktörlerden "boy, kilo, vücut kitle indeksi (VKİ) ve boya göre ağırlık" ile rs6918287 polimorfizmi genotiplerini karşılaştırdığımızda, normal, heterozigot ve homozigot guruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 17).

Tablo 17. Boy - VKİ - ağırlık - boya göre ağırlık ile rs6918287 polimorfizmi genotipleri arasındaki ilişki

Obezite Değişkenleri	rs6918287 Genotipleri			P
	GG	GA	AA	
Boy (ortalama, cm)	161,00	154,55	156,94	0,572
Boya göre ağırlık (ortalama, %)	148,00	147,90	157,04	0,789
Ağırlık (ortalama, kg)	72,00	66,14	73,15	0,624
VKİ (ortalama, kg/m^2)	27,00	27,25	29,46	0,381

Olgulardaki karaciğer yağlanması ve insülin direnci ile rs6918287 polimorfizminin genotipleri arasındaki ilişkiye bakıldığında, aralarında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 18 ve Tablo 19). Genotip dağılımlarına bakıldığında, homozigot mutant genotipe sahip olan bir olguda karaciğer yağlanması bulunmamaktaydı. Ayrıca, heterozigot genotipe sahip olgularda insülin direnci bulunma oranının 2 kat artabileceği görüldü.

Tablo 18. Karaciğer yağlanması ile rs6918287 polimorfizmi geneotipleri arasındaki ilişki

rs6918287	Kc yağlanması				Toplam		p	OR	95,0% C.I.		p
	Yok		Var								
	n	%	n	%	n	%			Alt Sınır	Üst Sınır	
GG	93	92,1	58	95,1	151	93,2	0,641	1,000			0,870
AG	7	6,9	3	4,9	10	6,2		1,455	0,362	5,852	0,597
AA	1	1,0	0	0	1	6		-	-	-	-
Toplam	101	100	61	100	162	100					

Tablo 19. İnsülin direnci ile rs6918287 polimorfizmi geneotipleri arasındaki ilişki

rs6918287	İnsülin direnci				Toplam		p	OR	95,0% C.I.		p
	Yok		Var								
	n	%	n	%	n	%			Alt Sınır	Üst Sınır	
GG	99	93,4	33	89,2	132	92,3	0,486				0,591
AG	6	5,7	4	10,8	10	7,0		**2,00**	0,532	7,525	0,305
AA	1	9	0	0	1	7					
Toplam	106	100	37	100	143	100					

Allel sıklıkları ile karaciğer yağlanması ve insülin direnci arasındaki ilişkiye bakıldığında, aralarında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Yapılan tahmini risk hesaplamalarında, A alleline sahip bireylerde karaciğer yağlanma oranının yaklaşık 1,8 kat artabileceği gözlendi (Tablo 20 ve Tablo 21).

Tablo 20. Karaciğer yağlanması ve rs6918287 polimorfizmi allel sıklıkları arasındaki ilişki

rs6918287	Kc yağlanması				Toplam		p	OR	95,0% C.I.	
	Yok		Var							
	n	%	n	%	n	%			Alt Sınır	Üst Sınır
G	193	61,9	119	38,1	312	100	0,546	**1,850**	0,491	6,969
A	9	75,0	3	25,0	12	100				
Toplam	202	62,3	122	37,7	324	100				

Tablo 21. İnsülin direnci ve rs6918287 polimorfizmi allel sıklıkları arasındaki ilişki

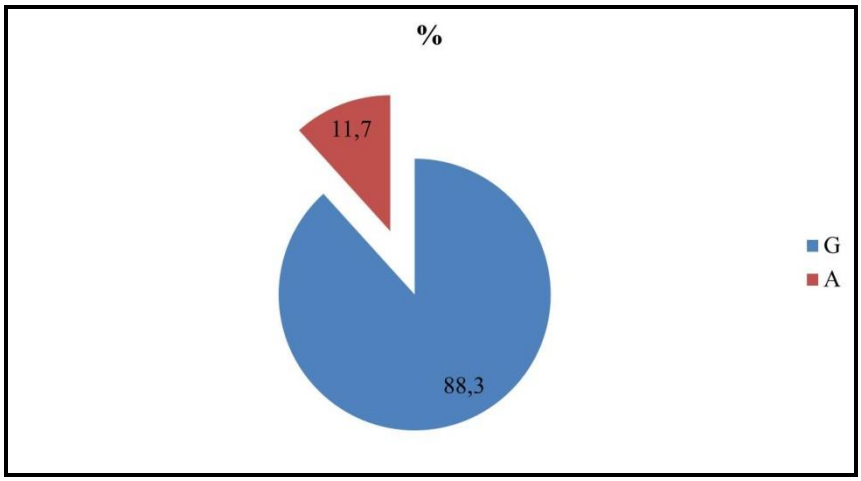
rs6918287	İnsülin direnci				Toplam		p	OR	95,0% C.I.	
	Yok		Var							
	n	%	n	%	n	%			Alt Sınır	Üst Sınır
G	204	74,5	70	25,5	274	100	0,378	1,457	0,426	4,988
A	8	66,7	4	33,3	12	100				
Toplam	212	74,1	74	25,9	286	100				

4.8. rs3765468 (G>A) Polimorfizmi:

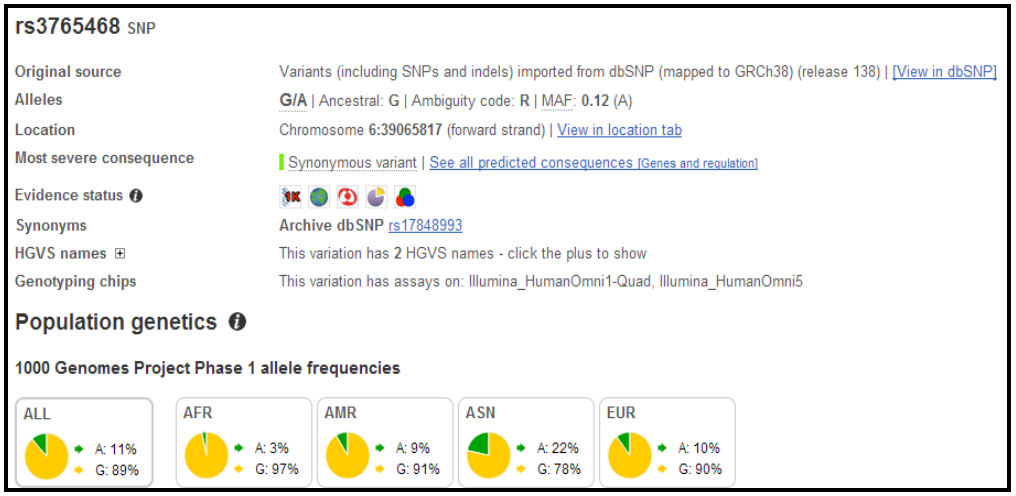
Saptanan rs3765468 (G>A) polimorfizmi, GLP-1R geni 4. ekzonda bulunan diğer bir polimorfizmdi. Tüm olguların 32'sinde (%19,7) heterozigot ve 3'ünde (%1,9) homozigot olarak bulundu (Tablo 22). Bu polimorfizme ait G allel sıklığı %88,3; A allel sıklığı %11,7 olarak bulundu ve allel sıklıkları veritabanlarında bildirilen değerler ile benzerdi (Şekil 8 ve Şekil 9). Cinsiyete göre genotip dağılımları arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi (Tablo 23).

Tablo 22. rs3765468 polimorfizmi genotip dağılımları

rs3765468	n	%
GG	127	78,4
GA	32	19,7
AA	3	1,9
Toplam	162	100



Şekil 8. rs3765468 polimorfizminin allel sıklıkları



Şekil 9. rs3765468 polimorfizminin popülasyon çalışmalarına göre allel sıklıkları

Tablo 23. Cinsiyet ve rs3765468 polimorfizmi genotipleri arasındaki ilişki

rs3765468	Cinsiyet				Toplam		p
	Erkek		Kız				
	n	%	n	%	n	%	
GG	70	81,4	57	75,0	127	78,4	0,460
GA	14	16,3	18	23,7	32	19,8	
AA	2	2,3	1	1,3	3	1,9	
Toplam	86	100	76	100	162	100	

Boy, kilo, VKİ ve boya göre ağırlık ile rs3765468 polimorfizmi genotiplerini karşılaştırdığımızda; normal, heterozigot ve homozigot gruplar arasında fark saptanmadı (Tablo 24).

Tablo 24. Boy - kilo – VKİ - boya göre ağırlık ile rs3765468 polimorfizmi genotipleri arasındaki ilişki

Obezite Değişkenleri	rs3765468 Genotipleri			p
	GG	GA	AA	
Boy (ortalama, cm)	157,04	156,41	151,67	0,529
Boya göre ağırlık (ortalama, %)	155,32	160,80	156,33	0,549
Kilo (ortalama, kg)	72,44	74,41	65,67	0,665
VKİ (ortalama, kg/m^2)	29,15	29,97	28,58	0,776

Karaciğer yağlanması ve insülin direnci olan olgularda rs3765468 polimorfizmi genotip dağılımları arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemesine rağmen, homozigot genotipe sahip olgularda karaciğer yağlanması görülme oranının 3 kat artabileceği ve heterozigot genotipe sahip olgularda insülin direnci görülme oranının yaklaşık 1,8 kat artabileceği söylenebilir (Tablo 25 ve Tablo 26).

Tablo 25. Karaciğer yağlanması ve rs3765468 polimorfizmi genotipleri arasındaki ilişki

rs3765468	Kc Yağlanması				Toplam		p	OR	95,0% C.I.		p
	Yok		Var								
	n	%	n	%	n	%			Alt Sınır	Üst Sınır	
GG	78	77,2	49	80,3	127	78,4	0,431	1,000			0,459
AG	22	21,8	10	16,4	32	19,8		1,382	0,604	3,165	0,444
AA	1	1,0	2	3,3	3	1,9		**0,314**	0,028	3,557	0,350
Toplam	101	100	61	100	162	100					

Tablo 26. İnsülin direnci ve rs3765468 polimorfizmi genotipleri arasındaki ilişki

rs3765468	İnsülin direnci				Toplam		p	OR	95,0% C.I.		p
	Yok		Var								
	n	%	n	%	n	%			Alt Sınır	Üst Sınır	
GG	84	79,2	26	70,3	110	76,9	0,206				0,364
AG	19	17,9	11	29,7	30	21,0		**1,870**	0,789	4,434	0,155
AA	3	2,8	0	0	3	2,1					
Toplam	106	100	37	100	143	100					

Olgularda, yağlı karaciğer ve insülin direnci olan gruplardaki rs3765468 polimorfizminin allel sıklıkları arasındaki ilişkiye bakıldığında, aralarında anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 27 ve Tablo 28).

Tablo 27. Karaciğer yağlanması ve rs3765468 polimorfizmi allel sıklıkları arasındaki ilişki

rs3765468	Kc yağlanması				Toplam		p	OR	95,0% C.I.	
	Yok		Var							
	n	%	n	%	n	%			Alt Sınır	Üst Sınır
G	178	62,2	108	37,8	286	100	0,532	1,040	0,516	2,097
A	24	63,2	14	36,8	38	100				
Toplam	202	62,3	122	37,7	324	100				

Tablo 28. İnsülin direnci ve rs3765468 polimorfizmi allel sıklıkları arasındaki ilişki

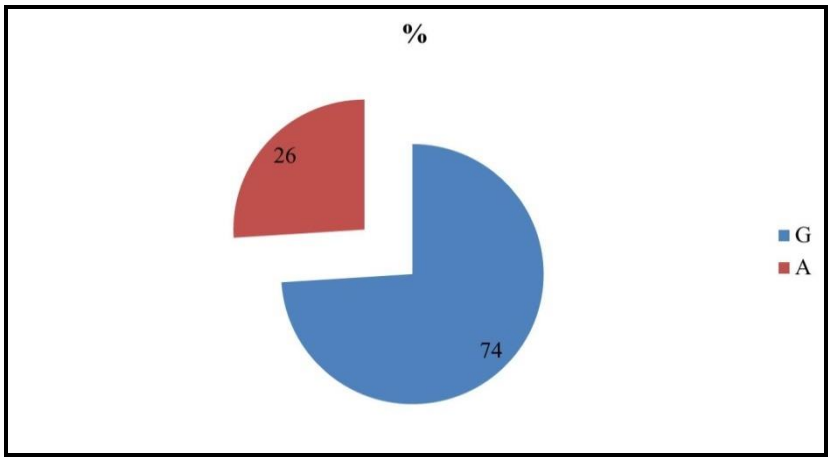
rs3765468	İnsülin direnci				Toplam		p	OR	95,0% C.I.	
	Yok		Var							
	n	%	n	%	n	%			Alt Sınır	Üst Sınır
G	187	74,8	63	25,2	250	100	0,308	1,306	0,608	2,805
A	25	69,4	11	30,6	36	100				
Toplam	212	74,1	74	25,9	286	100				

4.9. rs6923761 (G>A) Polimorfizmi:

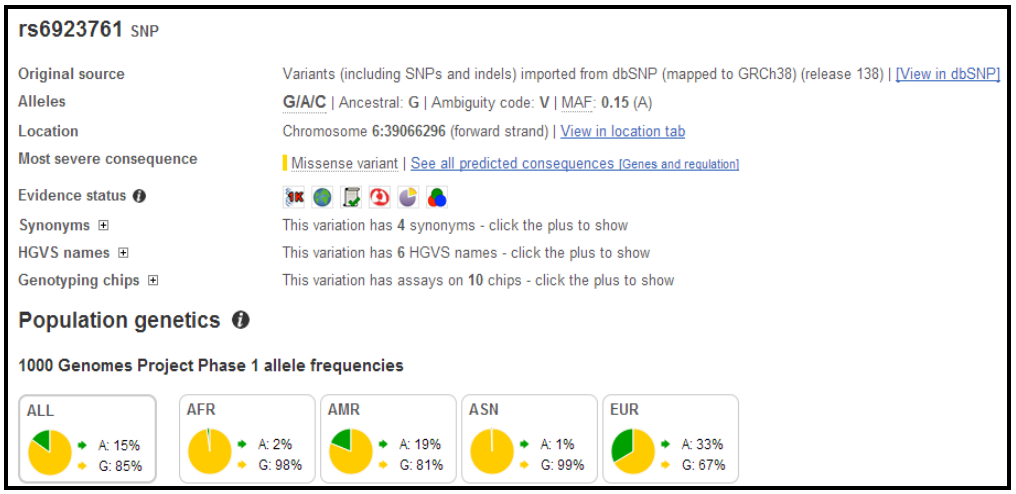
Çalışmada, GLP-1R geni 5. ekzonda saptanan rs6923761 (G>A) polimorfizmi, tüm olguların 58'inde (%36,0) heterozigot ve 13'ünde (%8) homozigot olarak bulundu. Bu polimorfizmin genotip dağılımları Tablo 29 'da gösterilmiştir. Bu polimorfizme ait G allel sıklığı %74; A allel sıklığı %26 olarak bulundu ve allel sıklıkları, daha çok Amerikan ve Avrupalı toplumların allel sıklıklarına benzerlik göstermekteydi (Şekil 10 ve Şekil 11). Bu genotipler ve cinsiyet dağılımları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 30).

Tablo 29. rs6923761 polimorfizmi genotip dağılımları

rs6923761	n	%
GG	91	56
GA	58	36,0
AA	13	8
Toplam	162	100



Şekil 10. rs6923761 polimorfizminin allel sıklıkları



Şekil 11. rs6923761 polimorfizminin popülasyon çalışmalarına göre allel sıklıkları

Tablo 30. rs6923761 polimorfizmi genotipleri ile cinsiyet arasındaki ilişki

rs6923761	Cinsiyet				Toplam		p
	Erkek		Kız				
	n	%	n	%	n	%	
GG	48	55,8	43	56,6	91	56,2	0,995
AG	31	36,0	27	35,5	58	35,8	
AA	7	8,1	6	7,9	13	8,0	
Toplam	86	100	76	100	162	100	

Obezite derecesini değerlendirmemizi sağlayan faktörlerden boy, kilo, VKİ ve boya göre ağırlık ile rs6923761 polimorfizmi genotiplerini karşılaştırdığımızda; homozigot genotipe sahip olgularda VKİ ortalaması anlamlı olarak daha düşük bulundu (*p=0,043*) (Tablo 31). Bunun üzerine, daha detaylı bir istatistiksel analiz olan *Mann Whitney-U* testi yapıldı ve VKİ ile bu polimorfizmin genotipleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi (Tablo 32).

Tablo 31. Boy – kilo - VKİ - boya göre ağırlık ile rs6923761 polimorfizmi genotipleri arasındaki ilişki

Obezite Değişkenleri	rs6923761 Genotipleri			p
	GG	GA	AA	
Boy (ortalama, cm)	156,54	157,35	156,35	0,866
Boya göre ağırlık (ortalama, %)	158,43	154,63	150,38	0,078
Kilo (ortalama, kg)	73,12	72,85	69,20	0,585
VKİ (ortalama, kg/m^2)	29,87	28,77	27,76	**0,043**

Tablo 32. Boy – kilo - VKİ - boya göre ağırlık ile rs6923761 polimorfizmi genotipleri arasındaki ilişki (*Mann Whitney-U* testi)

Obezite Değişkenleri	P Değerleri		
	GG-AA	AG-AA	GG-AG
Boy (ortalama, cm)	0,867	0,623	0,667
Boya göre ağırlık (ortalama, %)	0,196	0,911	0,406
Kilo (ortalama, kg)	0,532	0,994	0,933
VKİ (ortalama, kg/m^2)	0,112	0,964	0,245

Karaciğer yağlanması olan/olmayan ve insülin direnci olan/olmayan gruplar ile rs6923761 polimorfizminin genotip dağılımları arasındaki ilişkiye bakıldığında, aralarında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 33 ve Tablo 34). Fakat heterozigot genotipe sahip olgularda karaciğer yağlanması görülme oranının 1,7 kat artabileceği ve insülin direnci görülme oranının 1,6 kat azalabileceği söylenebilir. Homozigot genotipe sahip olgularda ise insülin direnci görülme oranının yaklaşık 2 kat azalabileceği gözlemlendi.

Tablo 33. Karaciğer yağlanması ve rs6923761 polimorfizmi genotipleri arasındaki ilişki

rs6923761	Kc yağlanması				Toplam		p	OR	95,0% C.I.		p
	Yok		Var						Alt Sınır	Üst Sınır	
	n	%	n	%	n	%					
GG	53	52,5	38	62,3	91	56,2	0,250	1,000			0,254
AG	41	40,6	17	27,9	58	35,8		**1,729**	0,857	3,490	0,126
AA	7	6,9	6	9,8	13	8,0			0,260	2,688	0,764
Toplam	101	100	61	100	162	100					

Tablo 34. İnsülin direnci ve rs6923761 polimorfizmi genotipleri arasındaki ilişki

rs6923761	İnsülin direnci				Toplam		p	OR	95,0% C.I.		p
	Yok		Var								
	n	%	n	%	n	%			Alt Sınır	Üst Sınır	
GG	56	52,8	24	64,9	80	55,9	0,437	1,000			0,442
AG	41	38,7	11	29,7	52	36,4		**0,626**	0,276	1,421	0,263
AA	9	8,5	2	5,4	11	7,7		**0,519**	0,104	2,581	0,423
Toplam	106	100	37	100	147	100					

Karaciğer yağlanması ve insülin direnci olan gruplar arasında rs6923761 polimorfizmi allel sıklıklarına baktığımızda, aralarında anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 35 ve Tablo 36). Bunun dışında, A alleline sahip olgularda insülin direnci görülme oranının 1,5 kat azalabileceği görüldü.

Tablo 35. Karaciğer yağlanması ve rs6923761 polimorfizmi allel sıklıkları arasındaki ilişki

rs6923761	Kc yağlanması				Toplam		p	OR	95,0% C.I.	
	Yok		Var							
	n	%	n	%	n	%			Alt Sınır	Üst Sınır
G	147	61,3	93	38,8	240	100	0,290	1,200	0,714	2,017
A	55	65,5	29	34,5	84	100				
Toplam	202	62,3	122	37,7	324	100				

Tablo 36. İnsülin direnci ve rs6923761 polimorfizmi allel sıklıkları arasındaki ilişki

rs6923761	İnsülin direnci				Toplam		p	OR	95,0% C.I.	
	Yok		Var							
	n	%	n	%	n	%			Alt Sınır	Üst Sınır
G	153	72,2	59	27,8	212	100	0,130	**0,659**	0,347	1,252
A	59	79,7	15	20,3	74	100				
Toplam	212	74,1	74	25,9	286	100				

4.10. R131Q mutasyonu:

Obezite nedeniyle izlenen 162 olgunun 3'ünde (%1,85) GLP-1R geni 4. ekzonda heterozigot R131Q mutasyonu saptandı. Mutasyon bulunan olguların hepsi erkekti. Bu olguların 1/3'ünde (%33,3) karaciğer yağlanması gözlenirken, hiçbirinde insülin direnci yoktu.

5.TARTIŞMA

Toplum araştırmaları, günümüzde sağlıklı toplumların devam ettirilmesi için en önemli çalışma konularını oluşturmaktadır. Bu amaçla toplumda sık görülen hastalıklar, problemler tespit edilmekte ve toplumun bu sorunlardan korunması için gerekli sağlık politikalarının geliştirilmesine katkı sağlanmaktadır.

Genel sağlık giderlerine ve epidemiyolojik araştırmalara baktığımızda, kalori alımı ile kalori harcaması arasında bir dengesizlik durumu olan obezite probleminin her geçen gün arttığı görülmektedir. Obezite, yalnız ülkemiz için bir problem değil, tüm dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen önemli bir sağlık problemidir ve sorun artık epidemi şeklinde izlenmektedir. Obezitenin en büyük problemlerden biri olduğu ABD'de, yetişkin nüfusun %65'i aşırı kilolu olarak değerlendirilirken, yapılan çalışmalarda bu sorunun her geçen yıl arttığı görülmüştür. Bu şekilde artan bir problemin, hem kendisi hem de kendisi ile ilişkili hastalıkların topluma getirdiği maliyet yükü açısından büyük bir kaynak kaybı olduğu yönünde veriler bulunmuştur (Flegal K M ve ark., 1998).

Çalışmamıza başlarken obezitenin ülkemiz için önemli bir problem olması ve ilerleyen yıllarda artan bir şekilde probleme dayalı sağlık uygulamalarının yapılandırılmasına katkı sağlama olasılığı düşünülerek obez çocuklarda genetik varyasyonların etkisinin gösterilmesi planlandı. Bu amaçla hipotezimiz "GLP-1 1 reseptörü geninde olabilecek genetik varyasyonların obezite, yağlı karaciğer ve diyabet ile ilişkisi bulunmaktadır" üzerine kuruldu. Obezite, çevresel faktörlerin etki ettiği genetik nedenlerin göz ardı edilemeyecek kadar fazla olduğu çoklu faktörlü bir problemdir. Toplumsal çalışmalar sosyolojik, davranışsal nedenler hakkında fikir vermeye çalışırken genetik çalışmalar obezitenin nedenlerini gelişimin ilk anından itibaren etnik farklılıklar temelinde ortaya çıkarmaya çalışır. Bu amaçla yapılmış pek çok çalışmada kromozom bölgeleri, genler sorumlu tutulmuş ve olgularda ilgili genlerin analizleri yapılmıştır. Çalışmamızda son yıllarda dikkat çekmeye başlayan GLP-1R geninde bulunan genetik varyasyonların gösterilmesine karar verilmiştir. GLP-1R, GLP-1 için reseptör olup vücutta etkisini bu yolla göstermektedir. İlgili reseptör-ligand bağlanmasını etkileyen her olay, GLP-1 in etki mekanizmasının değişmesine neden olabilmektedir (Runge S ve ark., 2010; Kim J G ve ark., 2003). Bu nedenle GLP-1R deki genetik değişikliklerin obez çocuklarda gösterilmesinin literatüre katkı sağlayacağı öngörülmüştür.

Çalışmaya alınan 162 çocuk olgunun boya göre ağırlık değerleri hesaplandığında 37'sinde (%25,8) insülin direnci olduğu görüldü ve bu çocukların % 37,6'sında karaciğer yağlanması olduğu tespit edildi. Karaciğer yağlanması olan olguların ise % 54,1'inde insülin direnci olduğu görüldü. Yağlı karaciğer olmayıp insülin direnci olan olguların oranının %45,9 olarak bulunması nedeniyle gruplar arasında yapılan istatistiksel analiz anlamlı bulundu ve bu şekilde yağlı karaciğer olmayan olgularda, insülin direncinin 2,6 kat daha az olduğu görüldü. Obez nüfusun % 60-70'inde karaciğer yağlanması bulunduğu tahmin edilmektedir. En tehlikelisi ise pediatrik nüfus içinde NAFLD'nin her geçen gün arttığının tespit edilmesidir. Yapılan çalışmalarda obez nüfusta % 60–70 oranında görülen yağlı karaciğer oranı bizim incelediğimiz grupta daha düşük olarak bulundu. Literatürde incelenen grupların yetişkinleri içermesi nedeniyle yağlı karaciğer oranının yüksek olduğunu düşünmekteyiz. Yağlı karaciğer gelişimi yaşa bağımlı olarak artmaktadır ve obezite alkolik olmayan karaciğer yağlanmasında önemli bir nedendir. İncelediğimiz grubun çocukluk çağı olması nedeniyle yetişkin gruptan daha az olarak yağlı karaciğer gelişmiş olduğu görüldü. Bulgularımız literatürle kıyaslandığında uyumlu bulundu (Schreuder T C ve ark., 2008; de Piano A ve ark., 2009; Younossi Z M, 2008).

Karaciğerin, sistemik insülin direnci gelişiminde önemli bir rol aldığı açıktır. Hipertrigliseridemi ve NAFLD, hepatosit ve adiposit insülin direnci ve aynı şekilde obezite ile güçlü ilişkileri vardır. Yağlı karaciğer ile insülin direnci arasında ilişki gösterilmiş olup incelediğimiz grupta da yağlı olmayan karaciğer olgularında insülin direncinin 2,6 daha az olduğu bulgusu literatür ile uyumlu bulundu (Sanal M G, 2008; Musso G ve ark., 2010).

Araştırmacılar, flöresan in situ hibridizasyon yöntemini kullanarak insan GLP-1R genini kromozom 6p21 bölgesine lokalize etmişlerdir (Stoffel M ve ark., 1993). GLP-1R geni on üç ekzondan oluşan bir gen olup, ürünü olan protein 463 amino-asitten oluşmaktadır (Thorens B, 1992; TokuyamaY ve ark., 2004). GLP-1R, türler arasındaki dizisini yüksek derecede korumaktadır. Örneğin, insan GLP-1R ve fare GLP-1R genleri %90 oranında dizi benzerliği göstermektedir. GLP-1R, GLP-1için de oldukça spesifiktir (Madsbad S ve ark., 2008; Brubaker P L ve ark., 2002). Literatüre bakıldığında, GLP-1R ile ilgili olarak yapılmış genetik araştırmanın az sayıda olduğu gözükmektedir. Türler arasında korunmuş olan bir gende bulunacak varyasyonların aynı tür içinde de daha az olacağı düşünülmektedir. Tokuyama ve ark. nın yaptığı çalışmada GLP-1R geninin tüm kodlayıcı ekzonlarına dizi

analizi yapılmış ve sonuçları rapor edilmiştir. Bu çalışmaya bakıldığında, gendeki varyasyonların özellikle 2, 4 ve 5inci ekzonlarda yoğunlaştığı görülmüştür. Çalışmamızda, sadece bu ekzonlar dizileme analizi ile incelendi. Çalışmamızın planlama aşamasında ilgili genin tümünün dizi analizi ile incelenmesi düşünüldü, fakat maliyet açısından sadece varyasyonların en yoğun şekilde gözlendiği ekzonlar ile sınırlı kalınmasına karar verildi (Tokuyama Y ve ark., 2004).

Analizler sonucunda bizim çalışmamızda ekzon 4'te iki (rs6918287 G>A ve rs3765468 G>A), ekzon 5'te bir polimorfizm (rs6923761 G>A) ve ekzon 4'te bir mutasyon (R131Q, c.392G>A) tespit edildi. Bunlarla ilgili olarak literatüre baktığımızda, sistematik SNP analizi yapan Tokuyama ve ark.'nın yapmış olduğu tüm gen dizileme çalışmasına göre; 4üncü ekzonda bir polimorfizm, 5inci ekzonda ise bir polimorfizm bulunmuştur (Tokuyama Y ve ark. 2004). Bu SNP'leri araştırdığımızda rs6918287 ve rs3765468 ile ilgili çalışmalar mevcut değilken, GLP-1R geninin 5inci ekzonunu ve rs6923761 polimorfizmini diyabet ve obezite açısından araştıran makaleler bulunmuştur (Sathananthan A ve ark., 2010; de Luis D A ve ark., Sep 2014; de Luis D A ve ark., Oct 2014; de Luis D A ve ark., Mar 2014).

Bulduğumuz SNP'lerin tümü genotip ve allel frekansları açısından hesaplanıp, hastalıkla ilişkisi ortaya çıkarılması için insülin direnci, karaciğer yağlanması ve obezite değişkenlerine göre analiz edildi.

rs6918287 Polimorfizmi; obezitesi olan 162 olgunun 10'unda (%6,2) heterozigot, birinde (%0,6) ise homozigot olarak saptandı. Homozigot mutant genotipe sahip olguda karaciğer yağlanması mevcut idi. Karaciğer yağlanması ile bu polimorfizmin allel frekanslarına bakıldığında, A (mutant) alleline sahip bireylerde karaciğer yağlanma riskinin 1,8 kat arttığı gözlemlendi, fakat bununla ilgili bir araştırma mevcut olmadığından karşılaştırabileceğimiz literatür bilgisi bulunamadı. Bu sebepten bu polimorfizmin karaciğer yağlanması üzerine olan muhtemel negatif etkisini saptamak ile literatüre katkıda bulunulduğunu düşünüyoruz.

rs6918287 polimorfizmini homozigot mutant olarak taşıyan olgumuzda insülin direnci yoktu, fakat analizlerin sonucu heterozigot genotipe sahip olan olgularda insülin direncinin 2 kat arttığını göstermekteydi. Homozigot genotipe sahip olan olgu bulunmadığından, insülin direnci açısından allel frekanslarında sağlıklı sonuç elde edilemedi.

rs3765468 polimorfizmi; tüm olguların 32'sinde (%19,7) heterozigot ve 3'ünde (%1,9) homozigot olarak bulundu. Yağlı karaciğer ve insülin direnci olan gruplardaki rs3765468 polimorfizminin allel sıklıkları arasındaki ilişkiye bakıldığında, aralarında anlamlı bir fark gözlenmedi, ama genotip dağılımları göz önünde bulundurduğumuzda homozigot mutant genotipe sahip olan olgularda karaciğer yağlanma riskinin 3 kat arttığı gözlemlendi. Bu artış, boy, kilo ve VKİ gibi obezite değişkenlerine yansımıyordu. Homozigot mutant genotipe sahip çalışma grubunda insülin direnci görülme sıklığına bakıldığında, anlamlı bir fark görülmezken, heterozigot grupta insülin direnci görülme riskinin 1,8 kat artmış olduğu gözlendi. Bu bulguların homozigot mutant ve heterozigot genotipe sahip olan bireylerde net bir ilişkisi gösterilemediği ve bu SNP ile ilgili yeterli araştırma mevcut olmadığından bu SNP'nin muhtemel negatif ilişkisini bularak literatüre katkıda bulunduğumuzu düşünmekteyiz.

Çalışmada, GLP-1R geni 5. ekzonda saptanan rs6923761 (G>A) polimorfizmi, tüm olguların 58'inde (%36,0) heterozigot ve 13'ünde (%8) homozigot olarak bulundu. Bu polimorfizme ait allel sıklıkları, daha çok Amerikan ve Avrupalı toplumların allel sıklıklarına benzerlik göstermekteydi. Bu SNP ile ilgili daha önceki çalışmalara baktığımızda, bu SNP'i diyabet ile karşılaştıran araştırmaların olduğu görülmüş ve genotipleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır (de Luis D A ve ark., Sep 2014; de Luis D A ve ark., Oct 2014). Fakat yapılan bir çalışmada, rs6923761polimorfizmi olan olgularda, GLP-1 verilmesinden sonra insülin sekresyonuna yanıtta hafif bir değişiklik olduğu gözlenmiştir (Sathananthan A ve ark., 2010). Bizim çalışmamızdaki insülin direnci ve bu SNP bağlantısına baktığımızda, heterozigot genotipe sahip olan bireylerde insülin direnci 1,6 kat azalmışken, homozigot genotipe sahip bireylerde bu azalma 2 kattı. A (mutant) alleline sahip bireylerde ise insülin direncinin 1,5 kat azaldığı gözlemlendi. Ayrıca heterozigot genotipe sahip bireylerde, karaciğer yağlanmasında 1,7 kat artış görülmesine rağmen, homozigot mutant genotipe sahip bireylerde anlamlı değerler elde edilmedi. Bu polimorfizmin allel sıklıkları ile karaciğer yağlanması arasındaki ilişkiye bakıldığında da anlamlı bir fark gözlenmedi.

Obezite değişkenleri ile rs6923761 polimorfizmini bağdaştırdığımızda, literatür bilgilerine göre mutant gurupta VKİ ortalamasında düşüş saptanmıştı (de Luis D A ve ark., Mar 2014). Bizim sonuçlarımızda da benzer bir ilişki homozigot mutant genotipe sahip olgularda saptandı. Bu olgulara daha ileri bir istatistiksel analiz yöntemi olan Mann Whitney-U testi yapıldı ve VKİ ile bu polimorfizmin genotipleri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı görüldü.

Bu polimorfizmlerin dışında, ekzon 4'te R131Q değişimi (c.392G>A) saptandı ve bu değişim veri bankalarında mutasyon olarak tanımlanmıştı. Bu mutasyonda, komplementer DNA'nın 392. pozisyonundaki G nükleotidi yerine A nükleotidi geçmiş ve bunun sonucunda, 131. pozisyondaki CGC kodonunun CAC kodonuna dönüşmesiyle Arjinin aminoasidi yerine Glisin aminoasidi kodlanmıştı. Bu mutasyon, heterozigot olarak 3 hastada gözlendi. Bu üç hastada, bu mutasyonun klinik özellikler ile bağlantılı olup olmadığı belli olmamakla birlikte, olguların hepsi erkekti. Literatürde, R131Q mutasyonu ve obezite ile ilişkisini gösteren yeterli bilgi olmaması nedeniyle, obezitenin gelişimine katkı sağlayabilecek bir mutasyon olduğunun söylenebilmesi için protein düzeyinde çalışmalara ihtiyaç vardır. Tüm bunların eşliğinde gelecek çalışmalarımızda, kullanılan olgu grubunun arttırılması ve genin fonksiyonel açıdan değerlendirmelerinin yapılması ile yeni bilgiler elde edilmesi planlanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın amaçları obezite tanısı almış çocuklarda GLP-1 reseptöründeki genetik değişiklikleri (mutasyon/polimorfizm) araştırılıp, bunların hastalıkla ilişkisinin yorumlanmasıydı. Bu amaca yönelik 162 obezite tanısı almış çocuğun DNA'sı ilgili bölgelerde DNA dizi analiziyle incelendi ve üç polimorfizm ve bir mutasyon bulundu. Polimormizm ve mutasyonlar açısından homozigot ve heterozigot genotipe sahip bireyler, en sık görünen tip ile karaciğer yağlanması ve insülin direnci açısından karşılaştırıldı. İstatistik analiz sonuçlarına göre bulunan polimorfizm ve mutasyonların karaciğer yağlanması ve insülin direnci oluşumu için olası riski arttırdığı gözlendi. Obeziteye ait değişkenlere göre araştırdığımızda ise anlamlı fark bulunmadı. Başlangıç hipotezimiz olan GLP-1R genetik değişikliklerinin obezite gelişimine etkisi vardır tezi reddedildi.

GLP-1reseptörünün on üç ekzondan oluşması ve oldukça fazla organda ifade edilmesinden dolayı bu reseptörün genine tam gen sekansı yapılması mantıklı bir yaklaşımdır, ancak materyal koşullarından dolayı hipotezimizi değişikliklerin en sık görüldüğü üç ekzon üzerine kurduk. Çalışmamızın devamında, bu genin bütün ekzonlarına ek olarak intronik bölgelerin de genetik değişikliklerinin tespit edilmesi açısından taranması planlandı. Ayrıca bu değişikliklerin, GLP-1'in kan değerleri ile karşılaştırılmasının daha bilgi verici olabileceği düşünüldü. Bu çalışmada bulduğumuz polimorfizm ve mutasyonların farklı etnik gruplar ve daha büyük populasyonlarda araştırılmasının obezite, yağlı karaciğer ve diyabet dışında metabolik hastalıklar ile ilişkisinin ortaya çıkmasına büyük fayda sağlayacağı düşünüldü.

7. KAYNAKLAR

Abouna G M, Kremer G D, Daddah S K, Al-Adnani M S ve ark. Reversal of nephropathy in human cadaveric kidneys after transplantation into non-diabetic recipients. Lancet. 1983; ii: 1274-80.

Adeyemo A, Luke A, Cooper R, Wu X ve ark. A genome-wide scan for body mass index among Nigerian families. Obes Res. 2003;11: 266-73.

Ahlkvist L, Brown K, Ahre´n B. Upregulated insulin secretion in insulin-resistant mice: evidence of increased islet GLP-1 receptor levels and GPR119-activated GLP-1 secretion. Endocrine Connections. 2013;10.1530/EC-12-0079.

Ahren B, Simonsson E, Larsson H, Landin-Olsson M, Torgeirsson ve ark. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes. Diabetes Care. 2012; 25: 869-75.

Ahren B, Landin-Olsson M, Jansson P A, Svensson M ve ark. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagons levels in type 2 diabetes. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2014; 89: 2078-84.

Anderson R, Jones P. What's new in type 2 diabetes? National Prescribing Centre document. Feb 2000;1-16.

Bagger J I, Knop F K, Lund A, Vestergaard H ve ark. Impaired regulation of the incretin effect in patients with type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96: 737-45.

Baggio L L, Drucker D J. Therapeutic approaches to preserve islet mass in type 2 diabetes. Annu Rev Med. 2006; 57: 265-81.

Baggio L L, Kim J G, Drucker D J. Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization in vitro but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis in vivo. Diabetes. 2004; 53 Suppl 3: 205-14.

Balkan B, Kwasnik L, Miserendino R, Holst J J, Li X. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV with NVP-DPP728 increases plasma GLP-1 (7-36 amide) concentrations and improves oral glucose tolerance in obese Zucker rats. Diabetologia. 1999; 42: 1324-31.

Banting F G, Best C H, Collip J B, Campbell W R ve ark. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. Can Med Assoc J. 1922; 12: 141-6.

Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease. Dig Dis. 2010; 28: 155-61.

Beinborn M, Worrall C I, McBride E W, Kopin A S. A human glucagon-like peptide-1 receptor polymorphism results in reduced agonist responsiveness. Regul Pept. 2005; 130(1-2): 1-6.

Bloomgarden, Treatment issues in type 2 diabetes. Diab. Care. 2002; 25: 614–19.

Bouchard C. The genetics of human obesity: recent progress. Bull Mem Acad R Med Belg. 2001; 156: 455-62; discussion 463-4.

Brubaker P L, Drucker D J. Structure-function of the glucagon receptor family of G protein-coupled receptors: the glucagon, GIP, GLP-1-1, and GLP-1-2 receptors. Receptors Channels. 2002; 8: 179-88.

Brubaker P L, Drucker D J. Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. Endocrinology. 2004; 145 (6): 2653-59.

Buchan A M, Polak J M, Capella C, Solcia E ve ark. Electronimmunocytochemical evidence for the K cell localization of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in man. Histochemistry. 1978; 56: 37-44.

Bullock B P, Heller R S, Habener J F. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. Endocrinology. 1996; 137 (7): 2968-78.

Buteau J. Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphophatidylinositol 3-kinase and increase transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. Diabetologia. 1999; 42: 856-64.

Butler A E, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R ve ark. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes. 2003; 52: 102-10.

Campos R V, Lee Y C, Drucker D J. Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. Endocrinology. 1994; 134 (5): 2156-64.

Cheatham B, and Kahn C R. Insulin action and the insulin signaling network. Endocr. 1995; Rev 16: 117-42.

Cole TJ, Lobstein T. Extended international (IOTF) body mass index cut-offs for thinness, overweight and obesity. Pediatr Obes. 2012; 7: 284-94.

Creutzfelt W. Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagons-like peptide 1(7-36)amide in type 1 diabetic patients. Diabetes Care. 1996; 19: 580-6.

Dahl-Jorgensen K, Brichmann-Hanssen O, Hanssen K F. Effect of near normoglycemia for two years on progression of early diabetic retinopathy, nephropathy, and neuropathy: the Oslo study. British Medical Journal. 1986; 293: 1194-9.

De Luis D A, Aller R, Izaola O, Bachiller R. Role of rs6923761 gene variant in glucagon-like peptide 1 receptor in basal GLP-1 levels, cardiovascular risk factor and serum adipokine levels in naive type 2 diabetic patients. Journal of Endocrinological Investigation. September 2014.

De Luis D A, Aller R, Izaola O, Lopez JJ ve ark. Effect of rs6923761 gene variant of glucagon-like peptide 1 receptor on metabolic response and weight loss after a 3-month intervention with a hypocaloric diet. J Endocrinol Invest. October 2014; 37(10): 935-9.

De Luis D A, Aller R, de la Fuente B, Primo D ve ark. Relation of the rs6923761 Gene Variant in Glucagon-Like Peptide 1 Receptor with Weight, Cardiovascular Risk Factor, and Serum Adipokine Levels in Obese Female Subjects. J Clin Lab Anal. March 2014; 28. doi: 10.1002/jcla.21735.

De Piano A, Tock L, Carnier J, Oyama L M ve ark. Negative correlation between neuropeptide Y/agouti-related protein concentration and adiponectinemia in nonalcoholic fatty liver disease obese adolescents suVKİtted to a long-term interdisciplinary therapy, Metabolism. 2009.

Deacon C F. Degradation of glucagons-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivoJ. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80: 952-7.

Deacon C F. Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagons-like peptide-1: in vitro and in vivo studies. Diabetologia. 1997; 40: A127-35.

Deacon CF, Mannucci E, Ahren B. Glycaemic efficacy of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors as add-on therapy to metformin in subjects with type 2 diabetes-a review and meta analysis. Diabetes Obes Metab 2012; 14: 762–7.

Degn K B, Juhl C B, Sturis J, Jakobson G ve ark. One week's treatment with the long-acting glucagons-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) mark.edly improves 24-h glycemia and a- and 3-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. Diabetes. 2004; 53: 1187-94.

Dillon J S, Tanizawa Y, Wheeler M B, Leng X-H ve ark. Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. Endocrinology 1993; 133: 1907-10.

Ding X, Saxena N K, Lin S, Gupta N A ve ark. Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. Hepatology. 2006; 43: 173-81.

Drucker D J. Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. Diabetes Care. 2003; 26: 2929-40.

Drucker D J. Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. Gastroenterology. 2002; 122: 531-44.

Drucker, D J. The glucagons-like peptides. Endocrinology. 2001; 142: 521-7.

Drucker D J, Development of glucagons-like peptide 1-based pharmaceuticals as therapeutic agents for the treatment of diabetes. Curr. Pharm. Design. 2001; 7: 1399–14.

Drucker D J, Nauck M A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. Lancet. 2006; 368 (9548): 1696-705.

Dupre J. Glycaemic effects of incretins in Type 1 diabetes mellitus: a concise review, with emphasis on studies in humans. Regul Pept. 2005; 128: 149-57.

Dupre J, Ross S A, Watson D, Brown J C. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. J Clin Endocrinol Metab. 1973; 37: 826-8.

Efendic S, Portwood N. Overview of incretin hormones. Horm Metab Res. 2004; 36: 742-6.

Egan J M, Bulotta A, Hui H, Perfetti R. GLP-1 receptor agonists are growth and differentiation factors for pancreatic islet beta cells. Diabetes Metab Res Rev. 2003; 19: 115-123.

Egan J M, Meneilly G S, Elahi D. Effect of 1-mo bolus subcutaneous administration of exendin-4 in type 2 diabetes. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2003; 284: E1072-E1079.

Ehses J A, Casilla V R, Doty T, Pospisilik J A ve ark. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide promotes beta-(INS-1) cell survival via cyclic adenosine monophosphate-mediated caspase-3 inhibition and regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. Endocrinology. 2003; 144: 4433-45.

Elahi D, McAloon-Dyke M, Fukagawa N K, Meneilly G S ve ark. The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (7-37) in normal and diabetic subjects. Regul Pept. 1994; 51: 63-74.

Elrick H, Stimmler L, Hlad C J, Arai Y. Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration. J Clin Endocrinol Metab. 1964; 24: 1076-82.

Fehmann H C, Goke R, Goke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. Endocr Rev. 1995; 16: 390-410.

Fineman M S, Bicsak T A, Shen L Z, Taylor K ve ark. Effect on glycemic control of exenatide (synthetic exendin-4) additive to existing metformin and/or sulfonylurea treatment in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2003; 26: 2370-7.

Flegal K M, Carroll M D, Kuczmarski R J, Johnson C L. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. Int J Obes Relat Metab Disord. 1998; 22: 39-47.

Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M ve ark. Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. Hepatology. 2009; 50: 772-80.

Ganda O P. Pathogenesis of macrovascular disease in the human diabetic. Diabetes. 1980; 29: 931-42.

Gentile C L, Pagliassotti M J. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. J Nutr Biochem. 2008; 19: 567-76.

Greig N H, Holloway H W, DeOre K. Once-daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. Am. J. Physiol. 1997; 273: E981-8.

Gromada J, Holst J J, Rorsman P. Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1. Pflugers. rch. 1998; 435: 583-94.

Gromada J, Dissing S, Bokvist K. Glucagon-like peptide-l increases cytoplasmic calcium in insulin- secreting beta TC3-cells by enhancement of intracellular calcium mobilization. Diabetes. 1995; 44: 767-74.

Gupta N A, Mells J, Dunham R M, Grakoui A ve ark. Glucagon-like peptide-1 receptor is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing hepatic steatosis in vitro by modulating elements of the insulin signaling pathway. Hepatology. 2010; 51: 1584-92.

Gutniak M, Orskov C, Holst J J, Ahren B ve ark. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. N Engl J Med. 1992; 326: 1316-22.

Gutniak M K, Juntti-Berggren L, Hellstrom P M, Guenifi A ve ark. Glucagon-like peptide-l enhances the insulinotropic effect of glibenclamide in NIDDM patients and in the perfused rat pancreas. Diabetes Care. 1996; 19: 857-63.

Gutzwiller J P, Drewe J, Goke B, Schmidt H ve ark. Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. Am J Physiol. 1999; 276: R1541-4.

Harmar A J. Family-B G-protein-coupled receptors. Genome Biol 2. 2001; REVIEWS 3013.

Holst J J, Deacon C F. Inhibition of the activity of dipeptidylpeptidase IV as a treatment for type 2 diabetes Diabetes. 1998; 47: 1663-70.

Holz G G, Kuhtreiber W M, Habener J F. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37). Nature. 1993; 361: 362-5.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15655033. 2014.

Hua Q. Insulin: a small protein with a long journey. Protein Cell. 2010; 1: 537-51.

Huang G, Li J, Fu H, Yan Z ve ark. Characterization of glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R) gene in chickens: functional analysis, tissue distribution, and identification of its transcript variants. Domestic Animal Endocrinology. 2012; 43: 1–15.

Imeryuz N, Yegen B C, Bozkurt A, Coskun T ve ark. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. Am J Physiol 1997; 273: G920-7.

Job D, Eschwege E, Guyot-Argenton C, Aubrey J P ve ark. Effect of multiple daily insulin injection on the course of retinopathy. Diabetes. 1976; 25: 463-9.

Johnson J D, Han Z, Otani K, Ye H ve ark. RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets. J. Biol. Chem. 2004; 499-506.

Juhl C B, Hollingdal M, Sturis J, Jakobson G ve ark. Bedtime administration of NN2211, a longacting GLP-1 derivative, substantially reduces fasting and postprandial glycemia in type 2 diabetes. Diabetes. 2002; 51: 424-9.

Kershaw E E, Chua S C, Leibel R L. Localization of a (CA)n repeat in glucagon-like peptide-1 receptor gene (GLP-1r) to proximal mouse chromosome 17 and its linkage to other markers. Mammalian Genome. 1995; 6: 301-3.

Kieffer T J, Habener J F. The glucagons-like peptides. Endocr.Rev. 1999; 20: 876-913.

Kim J G, Baggio L L, Bridon D P, Castaigne J P ve ark. Development and characterization of a glucagon-like peptide 1-albumin conjugate the ability to activate the glucagonlike peptide 1 receptor in vivo. Diabetes. 2003; 52 (3): 751-9.

Kjems L L, Holst J J, Volund A, Madsbad S. The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. Diabetes. 2003; 52: 380-6.

Klein R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. Diabetes Care. 1995; 18: 258-68.

Knop F K, Vilsboll T, Hojberg P V, Larsen S ve ark. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? Diabetes. 2007; 56: 1951-9.

Knop F K, Vilsboll T, Madsbad S, Holst J J ve ark. Inappropriate suppression of glucagon during OGTT but not during isoglycaemic i.v. glucose infusion contributes to the reduced incretin effect in type 2 diabetes mellitus. Diabetologia. 2007; 50: 797-805.

Kolterman O G, Buse J B, Fineman M S, Gaines E ve ark. Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. J. Clin. Endocrionl. Metab. 2003; 88: 3082-9.

Koole C, Wootten D, Simms J, Valant C ve ark. Polymorphism and Ligand Dependent Changes in Human Glucagon-Like Peptide-1 Receptor (GLP-1R) Function: Allosteric Rescue of Loss of Function Mutation. Molecular Pharmacology. 2011; 80: 486–97.

Kreymann B, Williams G, Ghatei M A, Bloom S R. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. Lancet. 1987; 2: 1300-4.

Kumar K G, Poole A C, York B, Volaufova J ve ark. Quantitative trait loci for carbohydrate and total energy intake on mouse chromosome 17: congenic strain confirmation and candidate gene analyses (Glo1, GLP-1r). Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007; 292: R207–R16.

Kumar K G, Byerley L O, Volaufova J, Drucker D J ve ark. Genetic variation in GLP-1r expression influences the rate of gastric emptying in mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007; 294: R362–R71.

Lalley P A, Sakaguchi A Y, Eddy R L, Honey N H ve ark. Mapping polypeptide hormone genes in the mouse: somatostatin, glucagon, calcitonin, and parathyroid hormone. Cytogenet. Cell Genet. 1987; 44: 92-97.

Lamont BJ, Li Y, Kwan E, Brown TJ ve ark. Pancreatic GLP-1 receptor activation is sufficient for incretin control of glucose metabolism in mice. Clin Invest. 2012; 122(1): 388-402

Lindgren O, Mari A, Deacon C F, Carr R D ve ark. Differential islet and incretin hormone responses in morning versus afternoon after standardized meal in healthy men. J Clin Endocrinol Metab. 2009; 94: 2887-92.

Lockie S H. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor in the Brain: Role in Neuroendocrine Control of Energy Metabolism and Treatment Target for Obesity. Journal of Neuroendocrinology. 2013; 25: 597–604.

MacDonald P E. The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. Diabetes. 2002; 51: S434-S42.

Madsbad S, Krarup T, Deacon C F, Holst J J. Glucagon-like peptide receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of diabetes: a review of clinical trials. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2008; 11: 491-9.

Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular cloning a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory. 1982.

Mathis D, Vence L, Benoist C. p-Cell death during progression to diabetes. Nature. 2001; 414: 792-8.

Matthews D R, Hosker J P, Rudenski A S, Naylor B A ve ark. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985; 28: 412-19.

Meier J J, Nauck M A. Incretins and the development of type 2 diabetes. Curr Diab Rep. 2006; 6: 194-201.

Meier J J. The contribution of incretin hormones to the pathogenesis of type 2 diabetes. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2009; 23: 433-41.

Meier J J, Deacon C F, Schmidt W E, Holst J J ve ark. Suppression of glucagon secretion is lower after oral glucose administration than during intravenous glucose administration in human subjects. Diabetologia. 2007; 50: 806-13.

Musso G, Gambino R, Cassader M. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. Obes Rev. 2010; 11: 430-45.

Nathan D M, Schreiber E, Fogel H, Mojsov S ve ark. Insulinotropic action of glucagonlike peptide-I-(7-37) in diabetic and nondiabetic subjects. Diabetes Care. 1992; 15: 270-6.

Nauck M A. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties, functions, and clinical implications. Am J Med. 2011; 124: S3-18.

Nauck M A. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in the treatment of diabetes. Horm Metab Res. 2004; 36: 852-8.

Nauck M A, Homberger E, Siegel E G, Allen R C ve ark. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. J Clin Endocrinol Metab. 1986; 63: 492-8.

Nauck M A, Heimesaat M M, Orskov C, Holst J J ve ark. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. J Clin Invest. 1993; 91: 301-7.

Nauck M A, Bartels E, Orskov C, Ebert R, ve ark. Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. J Clin Endocrinol Metab. 1993; 76: 912-17.

Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. Diabetologia. 1986; 29: 46-52.

Nauck M A, Heimesaat M M, Behle K, Holst J J ve ark. Effects of glucagons-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemis, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002; 87: 1239-46.

Nauck M A, Niedereichholz U, Ettler R, Holst J J ve ark. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. Am. J. Physiol. 1997; 273: E981-8.

Nauck M A. Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide-1 [7-36 amide] in type 2 (non-insulin dependent) diabetic patients. Diabetologia. 1993; 36: 741-4.

Nauck M. Therapeutic potential of glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetes. Diab. Med. 1996; 13: S39–S43.

Orskov C, Holst J J, Nielsen O V. Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. Endocrinology. 1988; 123: 2009-13.

Pederson R A, Brown J C. The insulinotropic action of gastric inhibitory polypeptide in the perfused isolated rat pancreas. Endocrinology. 1976; 99: 780-5.

Perfetti R. Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreaticduodenum hoeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. Endocrinology. 2000; 141: 4600-5.

Perley M J, Kipnis D M. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic sujbjects. J Clin Invest. 1967; 46: 1954-62.

Perusse L, Despres JP, Lemieux S, Rice T ve ark. Familial aggregation of abdominal visceral fat level: results from the Quebec family study. Metabolism. 1996; 45: 378-82.

Perusse L, Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC ve ark. The human obesity gene map: the 2004 update. Obes Res. 2005; 13: 381-490.

Pospisilik J A, Stafford S G, Demuth H U, McIntosh C H ve ark. Long-term treatment with dipeptidyl peptidase IV inhibitor improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in the VDF Zucker rat: a euglycemic-hyperinsulinemic clamp study. Diabetes. 2002; 51: 2677-83.

Pratley R E, Weyer C. The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus. Diabetologia. 2001; 44: 929-45.

Price R A, Cadoret R J, Stunkard A J, Troughton E. Genetic contributions to human fatness: an adoption study. Am J Psychiatry. 1987; 144: 1003-8.

Pridal L. Absorption of glucagons-like peptide-1 can be protracted by zinc or protamine. Int. J. Pharm. 1996; 136: 53-9.

Prigeon R L, Quddusi S, Paty B, D'Alessio D A. Suppression of glucose production by GLP-1 independent of islet hormones: a novel extrapancreatic effect. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003; 285: E701-7.

Rask E, Olsson T, Soderberg S, Johnson O ve ark. Impaired incretin response after a mixed meal is associated with insulin resistance in nondiabetic men. Diabetes Care. 2001; 24: 1640-5.

Rayfield E J, Ault M J, Keusch G T, Brothers M J ve ark. Infection and diabetes: the case for glucose control. American Journal o f Medicine. 1982; 72: 439-50.

Riebel U, Larsen M O, Rolin B, Carr R D ve ark. NN2211: a longacting glucagons-like peptide-1 derivative with anti-diabetic effects inglucoseintolerant pigs. Eur. J. Pharmacol. 2002; 451: 217-25.

Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. Am J Hum Genet. 1990; 46: 222-8.

Rorsman P, Renstrom E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. Diabetologia. 2003; 46: 1029-45.

Ross S A, Dupre J. Effects of ingestion of triglyceride or galactose on secretion of gastric inhibitory polypeptide and on responses to intravenous glucose in normal and diabetic subjects. Diabetes. 1978; 27: 327-33.

Runge S, Thogersen H, Madsen K, Lau J ve ark. Crystal structure of the ligand-bound glucagon-like peptide-1 receptor extracellular domain. Journal of Biological Chemistry. 2008; 283 (17): 11340-7.

Salehi M, Aulinger B, Prigeon R L, D'Alessio D A. Effect of endogenous GLP-1 on insulin secretion in type 2 diabetes. Diabetes. 2010; 59: 1330-7.

Salehi M, Vahl T P, D'Alessio D A. Regulation of islet hormone release and gastric emptying by endogenous glucagon-like peptide 1 after glucose ingestion. J Clin Endocrinol Metab. 2008; 93: 4909-16.

Sanal M G. The blind men 'see' the elephant-the many faces of fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2008; 14: 831-44.

Sandhu H, Wiesenthal S R, MacDonald P E, McCall R H ve ark. Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized dogs. Diabetes. 1999; 48: 1045-53.

Sathananthan A, Dalla Man C, Micheletto F, Zinsmeister A R ve ark. Common Genetic Variation in GLP-1R and Insulin Secretion in Response to Exogenous GLP-1 in Nondiabetic Subjects, A pilot study. Pathophysiology/ Complications, Diabetes Care. 2010; 33: Number 9.

Schirra J, Sturm K, Leicht P, Arnold R ve ark. Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans. J Clin Invest. 1998; 101: 1421-30.

Schreuder T C, Verwer B J, van Nieuwkerk C M, Mulder C J. Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis. diagnosis and treatment. World J Gastroenterol. 2008; 14: 2474-86.

Schroeder W T, Lopez L C, Harper M E, Saunders G F. Localization of the human glucagon gene (GCG) to chromosome segment 2q36-37. Cytogenet. Cell Genet. 1984; 38: 76-9.

Staffers D A, Kieffer T J, Hussain M A, Drucker D J ve ark. Insulinotropic glucagons-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet sizes in mouse pancreas. Diabetes. 1996; 49: 741-8.

Stoffel M, Espinosa R, Le Beau M M, Bell G I. Human glucagon-like peptide-1 receptor gene: localization to chromosome band 6p21 by fluorescence in situ hybridization and linkage of a highly polymorphic simple tandem repeat DNA polymorphism to other markers on chromosome 6. Diabetes. 1993; 42: 1215-18.

Stout R W. Glucose inhibits replication of cultured human endothelial cells. Diabetologia. 1982; 23: 436-9.

Stunkard A J. The Salmon lecture. Some perspectives on human obesity: its causes. Bull N Y Acad Med. 1988; 64: 902-23.

Szayna M, Doyle M E, Betkey J A. Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. Endocrinology. 2000; 141: 1936-41.

Taniguchi C M, Emanuelli B, Kahn C R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7: 85-96.

Tanizawa A C, Riggs S C, Elbein A, Whelan H ve ark. Human glucagon-like peptide 1 receptor gene in NIDDM: identification and use of simple sequence repeat polymorphisms in genetic analysis. Diabetes. 1994; 43: 752–7.

Thorens B. Glucagon-like peptide-1 and control of insulin secretion. Diabete Metab. 1995; 21: 311-18.

Thorens B, Porret A, Buhler L, Deng S P ve ark. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin- (9-39) an antagonist of the receptor. Diabetes. 1993; 42: 1678-82.

Thorens B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the glucoincretin hormone glucagon-like peptide 1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992; 89: 8641-5.

Tokuyama Y, Matsui K, Egashira T, Nozaki O ve ark. Five missense mutations in glucagon-like peptide 1 receptor gene in Japanese population. Diabetes Res Clin Pract. 2004; 66: 63-9.

Tricoli J V, Bell G I, Shows T B. The human glucagon gene is located on chromosome 2. Diabetes. 1984; 33: 200-2.

Trumper A, Trumper K, Horsch D. Mechanisms of mitogenic and anti-apoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in beta(INS-1)-cells. J Endocrinol. 2002; 174: 233-46.

Turner J L, Bierman E L. Effect of glucose and sorbitol on proliferation of cultured human skin fibroblasts and arterial smooth muscle cells. Diabetes. 1978; 27, 583-8.

Underwood C R, Garibay P, Knudsen L B, Hastrup S ve ark. Crystal structure of glucagon-like peptide-1 in complex with the extracellular domain of the glucagon-like peptide-1 receptor. Journal of Biological Chemistry. 2010; 285 (1): 723-30.

Valerio G, Licenziati M R, Iannuzzi A, Franzese A ve ark. Insulin resistance and impaired glucose tolerance in obese children and adolescents from Southern Italy. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2006; 16: 279-84.

Van Hoek M, Dehghan A, Witteman JC, Van Duijn CM ve ark. Predicting type 2 diabetes based on polymorphisms from genome-wide association studies: a population-based study. 2008; 57(11): 3122-8.

Villhauer E B, Brinkman J A, Naderi G B, Dunning B E ve ark. 1-[2-[(5-Cyanopyridin-2-yl)amino]ethylamino]acetyl-2-(S)-pyrrolidinecarbonitrile: a potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties. J. Med. Chem. 2002; 45: 2362-5.

Vilsboll T, Knop F K. Effect of incretin hormones GIP and GLP-1 for the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Ugeskr Laeger. 2007; 169: 2101-5.

Vogler G P, Sorensen T I, Stunkard A J, Srinivasan M R ve ark. Influences of genes and shared family environment on adult body mass index assessed in an adoption study by a comprehensive path model. Int J Obes Relat Metab Disord. 1995; 19: 40-5.

Wang Q, Li L, Xu E, Wong V ve ark. Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic INS-1 beta cells. Diabetologia. 2004; 47: 478-87.

Weir G C, Mojsov S, Hendrick G K, Habener J F. Glucagon-like peptide-l (7-37) actions on endocrine pancreas. Diabetes 1989; 38: 338-42.

White J W, Saunders G F. Structure of the human glucagon gene. Nucleic Acids Res. 1986; 14: 4719-30.

Willms B, Werner J, Holst J J, Orskov C, Creutzfeldt W, Nauck M A. Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab. 1996; 81: 327-32.

Yip R G, Boylan M O, Kieffer T J, Wolfe M M. Functional GIP receptors are present on adipocytes. Endocrinology. 1998; 139: 4004-7.

Young A A, Gedulin B R, Bhavsar S. Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db)mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (Macaca mulatta). Diabetes. 1999; 48: 1026-34.

Younossi Z M. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. Aliment Pharmacol. 2008; Ther 28: 2-12.

Zander M, Madsbad S, Madsen J L, Holst J J. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. Lancet. 2002; 359: 824-30.

Zhang Y, Cook J T E, Hattersley AT, et al. Non-linkage of the glucagon-like peptide 1 receptor gene with maturity onset diabetes of the young. Diabetologia. 1994; 37: 721–4.

8.EKLER

Ek-1: Bilgilendirilmiş Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Çocukluk yaş grubunda obesiteye neden olabilecek genetik farlılıkları araştırmak amacı ile bir çalışma yapmaktayız. Araştırmanın ismi " ***GLP1 Reseptör Polimorfizmlerinin Obesiteye Olan Etkilerinin Araştırılması***" dır.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmanın Adı: ***GLP1 Reseptör Polimorfizmlerinin Obesiteye Olan Etkilerinin Araştırılması***

Sorumlu araştırmacılar: Prof. Dr. Ayfer Ülgenalp,
Araştırmanın Yürütüleceği Klinik: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı / Çocuk Genetik Bilim Dalı ve Çocuk Metabolizma Bilim Dalı ve Tıbbi Genetik AD

Obesite, çevresel faktörler ile kişinin genetik temellerinde birlikte gelişen bir sağlık problemidir. Bu problemin nedenlerinin ortaya çıkarılmasında pek çok açıdan farklı araştırma yapılmıştır. Obesite ile ilgili çalışmalara bakıldığında hastalığın ciddiyeti, tedaviye yanıt derecesi ve aile içinde hastalığın yaygınlığını saptamada genetik farklılıkların önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Obesitenin ortaya çıkarılmasında rol oynayan genlerin bulunması, bireysel hastalık tanısı, prognoz ve tedavi kararlarının verilmesi konusunda yardımcı olacaktır.

GLP1 reseptör geni, vücutta şeker metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan bir maddedir ve bu GLP1 proteini üzerinden vücutta şekerin hücre içine alınmasını, işlenmesini ve depolanmasını kontrol etmektedir. İlgili protein, GLP1 reseptörü üzerinden etki etmekte ve bu etki vücutta pek çok organda ortaya çıkmaktadır. Sindirim sistemi ve beyin bu reseptörün en çok görüldüğü organlardır. Birçok hastalıkta olduğu gibi çocukluk obesitesinde de bireysel genetik farklılıklar olabilmektedir. Bu çalışmada obesite tanısı ile izlenen çocuğunuzun kan örneğinde GLP1 reseptör geninde bireysel farklılık olup olmadığı araştırılacaktır.

İşlem öncesinde kolundaki uygun bir damardan bir kez olmak üzere 5cc kan örneği alınacaktır. Alınan örnekler Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Genetik Bilim Dalı laboratuvarında değerlendirmeye alınacaktır. Çalışmaya 150 tane kilosu normal sınırların üstünde olan çocuğun alınması planlanmıştır. Çalışmanın sonuçları ve hastalığa etkisi ile ilgili sonuçları, isterseniz ve gerekli olduğu durumda genetik danışmada size verilecektir.

Araştırma giderleri size veya sosyal güvenlik kurumunuza yüklenmeyecektir. Eğer bu çalışmada yer almak istemiyorsanız bunu belirtmeniz yeterlidir. **Gönüllü bu çalışmaya katılmayı kabul etmeme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir.** Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın :	**Velisinin:**
Ad/Soyad:	Ad/Soyad:
Tarih	Tarih:
Telefon:	Telefon:
İmza:	İmza:

Olur Alma İşlemine Tanıklık Eden:

Kuruluş Görevlisinin	**Araştırma Yapan Araştırmacının**
Ad/Soyad:	Ad/Soyad:
Tarih:	Tarih:
Telefon:	Telefon:
İmza:	İmza:

Ek-2: Etik Kurul Onayı

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2013/15-12**	**Tarih: 25.04.2013**
	Prof.Dr.Ayfer ÜLGENALP'ın sorumlusu olduğu **"GLP1 Reseptör Polimorfizmlerinin Obeziteye Olan Etkilerinin Araştırılması"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Psikiyatri Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Işıl TEKMEN	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Müge KİRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

Ek-3: Özgeçmiş



CURRICULUM VITAE

Mahafarin Maralani
Date of Birth:23.06.1987
Address: Molecular Medicine Department, Shool of Medicine, Dokuz Eylul University, Narlıdere, Izmir, Turkey.
Phone: +90 543 8323390
Email: mah_afarin@hotmail.com

Educational Background:

- 2012 M.Sc. student of Molecular Medicine
  Department of Molecular Medicine, Dokuz Eylul University, Izmir,Turkey.

- 2006-2010 B.S. of Nutrition and Dietetics.
  Department of Nutrition, Science Faculty, Tabriz Medical University, Tabriz, Iran.
  (B.S Thesis: An RCT on the influence of low calorie diet on patients with NAFLD)

Research Interests:

- Genetics
- Hereditary disease
- Molecular Medicine
- Oncology & Oncogenes

Congress, Seminars, and Workshops Attended:

- Optimization Techniques for Western Blot, Immunoprecipitation and immunohistochemistry. (27 April 2012, Izmir, Turkey)
- Use of moleculer visualisation in the teaching practice (2-4 April 2012, Izmir, Turkey)
- 10.National Medical Genetics Conference (20-23 December 2012, Bursa, Turkey)
- 1.National Paediatric Genetics Symposium (26-27 September 2013, Izmir, Turkey)
- 1.Hematologic Genetics symposium (2-4 December 2013, Izmir, Turkey)

RESEARCH EXPERIENCE AND SKILLS:

❖ ***Research Experience:***

.

- Molecular Analysis of Human Genetic Diseases.
- Associate researcher in approved Project entitled "Insulin and leptin among young people".
- Interviewer in the Project entitled "Leptin, resistin and stress in NAFLD".
- Cooperator in data analysis and reporting final results in the Project entitled "An RCT on the influence of low calorie diet on patients with NAFLD".

❖ ***Laboratory Skills***

Molecular Biology Techniques:

- DNA and RNA extraction and purification (18 months)
- PCR and related techniques (18 months)
- Electrophoresis (18 months)
- MLPA (2 months)
- DNA-sequencing (15 months)
- Cytogenetic analysis (6 months)
- PCR-RFLP (4 months)
- Real-time PCR (4 months)
- FISH (2 months)

❖ **Project for a Short-Term Research Visit:**

As part of the Erasmus programme (visit to Genomic Research Center of Iuliu Haţieganu University of Medicine and Pharmacy between 01 March–01 August 2014)

❖ ***Languages***

English, Persian, Azeri and **Turkish.**

Language Certificates:

- Ankara University, Turkish Language Test (93/100) (Test Date: 22.12.2010).
- International English Language Testing System(ACADEMIC)(6.5/9) (Test date: 10.07.2010)
- ETS Test Center, GRE Test (Quantitative: 161/170 and Verbal: 137/170) (Test Date: 01.02.2010).

Work Experience:

- **Tabriz Medical Sience University, Department of Physiology. 2008-2010. (As an Apprentice)**
- **Medical Genetics Department, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey. 2011-2014 (As a Trainer in Molecular Medicine)**

References:

Prof. Dr. Ayfer Ulgenalp, Medical Genetics and Pediatrics dep., Dokuz Eylul, Izmir,Turkey.
Email:Ayfer.ulgenalp@deu.edu.tr
Tel: +902324123666 - 3668

Prof. Dr.Gul Guner Akdogan, Chair, Department of Molecular Medicine, School of Medicine, 9Eylul University, Izmir, Turkey.
Email:Gul.guner@deu.edu.tr
Tel: +902324124403
Cell: +905337491796

Ass. Dr.M.Ebrahimi Mameghani,Nutritional Epidemiology, School of Public Health and Nutrition, Tabriz,Iran.
Email:ebrahimim@hotmail.com

Dr. Tufan Cankaya, Medical Biology and Genetics Dep., Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey. tcankaya@gmail.com

January 2014