



Ankara Sağlık Bilimleri Dergisi
Journal of Ankara Health Sciences



e-ISSN: 2618-5989

Tip 2 Diyabet Modeli Ratların Karaciğer Dokularında Kodlanan Genlerin İfade Düzeyleri
Levels of Genes Encoded in Type 2 Diabetes Model Rat Liver Tissues

Lütfiye Özpak^{1*}, Ayfer Pazarbaşı²

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye

²Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

Makale Bilgisi	ÖZ
<i>Geliş Tarihi:</i> 06.02.2021	Amaç: Obezite ve tip 2 diyabet çevresel ve genetik faktörlerin bir araya gelerek meydana getirdiği multifaktöriyel bir durumdur. Bu çalışmada, yüksek yağlı diyet ve Streptozotosin (STZ) ile tip 2 diyabet modeli oluşturulan ratlarda, daha önce yapılan çalışmalarda tip 2 diyabet ve obezite için aday gen olarak belirlenen ve karaciğer dokusunda eksprese olan HNF4A, LMNA, WFS1, ADAMTS9 genlerinin mRNA düzeylerinin incelenmesi hedeflenmiştir.
<i>Kabul Tarihi:</i> 21.06.2021	Örneklem ve Yöntem: Ratlara, 20 hafta yüksek yağlı diyet (%50 iç yağı), tek doz intraperitoneal STZ enjeksiyonu, insülin tolerans testi uygulanmıştır. Tüm ratlar 20. hafta sonunda sakrifiye edilmiş ve moleküler analizler için karaciğer dokusu izole edilmiştir. Real-time PCR ile tüm gruplarda HNF4A, LMNA, WFS1, ADAMTS9 genlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bulgular: Çalışmanın sonuçlarına göre HNF4A, LMNA, WFS1, ADAMTS9 mRNA ekspresyon seviyeleri tip 2 diyabet ve obezite modeli ratlarda kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur. Sonuç: Tip 2 diyabet ve obezite patofizyolojisinin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunan bu çalışma, terapötik yaklaşımda, potansiyel yeni belirteçler olarak HNF4A, LMNA, WFS1, ADAMTS9'un değerlendirilebileceğine işaret etmektedir.
	Anahtar Kelimeler: Deneysel, gen ekspresyon profili, obezite, tip 2 diyabet

Article Information	ABSTRACT
<i>Received:</i> 06.02.2021	Aim: Obesity and type 2 diabetes are a multifactorial condition caused by environmental and genetic factors. In this study, we aimed to do examine the mRNA levels of HNF4A, LMNA, WFS1, ADAMTS9 genes, which were identified as candidate genes for type 2 diabetes and obesity in previous studies and expressed in liver tissue, in rats created with a type 2 diabetes model with high fat diet and Streptozotocin (STZ). Subject and Method: Rats were given with high-fat diet (involved %50 fat) for 20 weeks received of STZ (40mg/ml) single dose with intraperitoneal injection and insulin tolerance test were carried out. All of rats were sacrificed at the end of 16 weeks and livers were removed for molecular analysis. Real Time PCR was performed to compare the expression levels of HNF4A, LMNA, WFS1 and ADAMTS9 genes in groups. Results: According to the results of the study, HNF4A, LMNA, WFS1, ADAMTS9 mRNA expression levels were found to be lower in type 2 diabetes and obesity model rats compared to the control group. Conclusion: This study, which contributes to the understanding of the molecular mechanisms underlying the pathophysiology of type 2 diabetes and obesity, points out that HNF4A, LMNA, WFS1, ADAMTS9 can be evaluated as potential new biomarkers in the therapeutic approach.
<i>Accepted:</i> 21.06.2021	Keywords: Experimental, gene expression profiling, obesity, tip 2 diabetes
doi: 10.46971/ausbid.875579	Araştırma Makalesi (Research Article)

*Sorumlu yazar/corresponding author: Lütfiye Özpak, lutfiyeozpak@gmail.com

Bu çalışma 'Diyabet modeli oluşturulmuş sıçan hipokampusünde alzheimer ilişkili ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN genlerinin ekspresyon profillerinin incelenmesi' isimli doktora tez çalışmasından elde edilen verilerden üretilmiştir.

Giriş

Tip 2 diyabet (T2D), 21. yüzyılda dünyada ve Türkiye’de tıbbın karşılaştığı en ciddi sağlık problemlerinden birisi olmakla birlikte, gittikçe artan önemli mortalite ve morbidite nedenidir (Peterson ve ark., 2018). Uluslararası Diyabet Federasyonu’nun 2019 diyabet atlası verilerine göre, dünyada 463 milyondan fazla insan diyabetlidir ve dünyadaki diyabetli birey sayısının 2045 yılında %51 oranında artarak 700 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Türkiye, 20-79 yaş aralığında diyabetli birey sayısı açısından değerlendirildiğinde, 2019 yılında belirlenen en riskli 10 ülke arasında yer almamaktadır. Ancak, 2045 yılında diyabetli birey sayısının 10.4 milyona ulaşarak, ülkemizin en riskli 10. ülke olacağı düşünülmektedir (International Diabetes Federation, 2019). Tüm diyabet vakalarının %90-95’ni oluşturan tip 2 diyabet, sedanter yaşam ve kötü beslenme ile ortaya çıkan ileri yaşlarda görülme sıklığı artan bir diyabet tipidir (American Diabetes Association, 2010; American Diabetes Association, 2018). Tip 2 diyabet patofizyolojisinde, insülin duyarlılığında ilerleyici yönde bir azalma, bunun sonucunda insülin direnci ve pankreas beta hücrelerinde fonksiyon bozukluğu meydana gelir (Javeed ve ark., 2018).

Tip 2 diyabetin risk faktörleri arasında obezite başı çekmektedir, tip 2 diyabetli hastaların %90’ı obezdir. İnsülin direnci ve obezite karaciğer yağlanması ile ilişkilidir. Karaciğer yağlanması, tip 2 diyabet için de risk faktörüdür. Obeziteyle birlikte trigliserit depolarının artışı ve karaciğer yağlanması sonucu glikoneogenez artar, glikojen sentezi azalır ve insülin sinyali uyarılır. Birbirini tetikleyen metabolik anormallikler kaskadı sonucunda, multifaktöriyel bir hastalık olan T2D meydana gelir (Rhee, 2019).

Diyabet, pankreatik beta hücre fonksiyonu, insülin etkisi, glikoz metabolizması ve diğer metabolik koşullar göz önünde bulundurularak, tip 2 diyabet ve obezite için aday genler belirlenmiştir. Bu genler metabolik yollardaki rollerine, hayvan çalışmalarından elde edilen kanıtlara ve genetik bağlantı çalışmalarına dayanarak seçilmiştir (Ingelsson & McCarthy, 2018). Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda obezite ve diyabet için aday gen olarak belirlenen genlerden birkaçı HNF4A(Hepatosit Nükleer Faktör 4 α), LMNA (Lamin A/C), WFS1 (Wolfram syndrome 1), ADAMTS9 (A disintegrin and metalloproteinase with trombospondin motif 9)’ dur (Vimalaswaran & Loos, 2010; Gloyn ve ark., 2008). HNF4A tarafından kodlanan protein, DNA’yı bir homodimer olarak bağlayan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. HNF4A; steroid/tiroid hormon reseptörleri süper ailesinin bir üyesidir ve karaciğer, böbrek, pankreas adacık hücreleri ve bağırsaklarda ekspresyonları korunmuştur. HNF1A’ nın temel aktivatörü olup, bunun sonucunda karaciğer ile ilgili glikoz, kolesterol ve yağ asidi metabolizmasında görevli çok sayıda genin ekspresyonlarını düzenler (Arya ve ark., 2014). LMNA, lamin protein ailesine ait olan LMNA proteinini kodlayan bu genin, insülin direnci, diyabet, hipertrigliseridemi, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Ajluni ve ark., 2017). Wfs1, endoplazmik retikulumla lokalize, membran glikoproteini olup, integral endoglikozidaz olan wolframini kodlar. Fare ve insanda wolframin eksikliği sonucunda da pankreatik beta hücrelerinde kayıp meydana gelir (Vimalaswaran & Loos, 2010). ADAMTS9, ADAMTS ailesi üyelerinden olup, hücre-hücre etkileşimi ve proteolizinde sorumludur ve ekstraselüler matrikse salınır. Daha önce yapılan çalışmalarda, bu genin tip 2 diyabet ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Zeggini ve ark., 2008). Bu çalışmada yüksek yağlı diyet ve Streptozotisin ile obezite ve diyabet oluşturulmuş rat modeli üzerinde, HNF4A, LMNA, WFS1, ADAMTS9 genlerinin ekspresyon seviyelerini inceledik.

Örneklem ve Yöntem

Hayvanların Bakımı

Çalışmada 180-200 gram ağırlığında 40 adet sıçan (7-10 haftalık, erkek) Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (TIBDAM)'nden temin edilmiştir. Çalışma süresince, 12:12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü bulunan, 22-25° C, %40-60 rölatif nem koşullarına sahip odada bakımları yapılan sıçanlara, deney süresi boyunca gruplara yönelik yüksek enerjili ve normal yemle beslenme ve taze günlük su temini sağlanmıştır. Hayvanlara yapılan tüm müdahaleler, Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar için Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan, 24.04.2017 tarihli, 4 sayılı toplantı kararı ile etik kurul belgesi alınmıştır.

Diyabet ve Obezite Modellerinin Oluşturulması

İki ortalama arasındaki farkı $\alpha=0.05$ olması durumunda %99 güç ile saptayabilecek örneklem büyüklüğü güç analizi ile her grupta 10 sıçan olacak şekilde, deney grupları belirlenmiştir. Buna göre birinci grup, yüksek yağlı diyet ile beslenmiş ve streptozotosin enjeksiyonu yapılmış, ikinci grup, yüksek yağlı diyet ile beslenmiş, üçüncü grup, normal diyet ile beslenmiş ve streptozotosin enjeksiyonu yapılmış, dördüncü grup ise normal diyet ile beslenmiştir.

Yüksek yağlı diyet için yem, %5 yağlı soya, %5 tavuk unu ve %50 iç yağı, normal pelet yem ile homojenize edilerek hazırlanmıştır. Yüksek yağlı diyet için yem, literatürde yer alan çalışmalar dikkate alınarak hazırlanmıştır (Hazman Ö., 2011; Kamenov ve ark., 2006; Reed ve ark., 2000). İnsülin direnci gelişimini tespit etmek için altı hafta sonunda testten iki saat önce aç bırakılan ratlara, 0.5 U/kg dozunda insülin deri altından enjekte edilerek, insülin tolerans testi uygulanmıştır. Literatür verilerine dayanarak, ağırlık artışı en az %5 olan ve insülin direnci gelişen yüksek yağlı yem ile beslenen gruptaki ratlarda, obezite modeli olduğu kabul edilmiştir (Hazman Ö., 2011; Furnes ve ark., 2009; Matthews ve ark., 1985). Sekiz hafta sonunda, tip 2 diyabet modeli oluşturulacak ratlara, ağırlıklarına uygun olacak hacimlerde 0.1M sitrat tamponu içerisinde çözündürülerek hazırlanan, STZ 45 mg/kg oranında kuyruk veninden tek doz uygulanmıştır. Uygulamadan 48 saat sonra-kan glikoz seviyeleri, Accu-check go cihazı yardımı ile ölçülmüştür. Kan şekeri 300 mg/dl üzerinde olan ratlarda tip 2 diyabet modeli geliştiği kabul edilmiştir. Deney süresi boyunca, haftada bir kez olmak üzere ratların vücut ağırlığı değişimi ve kan glikoz seviyeleri takip edilmiştir. Yirminci hafta sonunda, ketamin ksilazin ile anestezisi altındaki ratlar dekapite edilmiş ve karaciğer dokuları moleküler analiz için izole edilmiştir.

Moleküler Analizler

Karaciğer Dokusundan RNA İzolasyonu

Deney sonunda izole edilen karaciğer doku örnekleri, RNA izolasyonu işlemi yapılana kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu için Trizol yöntemi kullanılmıştır (Chomczynski & Mackey, 1995). İlk aşamada, buz üzerinde 50-100 mg doku, bistüri yardımı ile parçalanmış ve üzerine 1ml trizol eklenmiştir. Trizol ile izolasyon protokolüne bağlı kalınarak, RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. En son elde edilen RNA pelet miktarına göre 20-50 µl DEPC su eklendi. Pipetaj yapıp, cDNA sentezi yapılana kadar -80 °C'de depolanmıştır. RNA konsantrasyonları ve A₂₆₀/A₂₈₀ oranı nanodrop yardımı ile ölçülüp, saflık oranları belirlenmiştir. Elde edilen konsantrasyon sonuçları 100-600 ng/µl, nükleik asit saflığı ise ortalama 2 olarak ölçülmüştür.

cDNA Sentezi ve Real-Time PCR

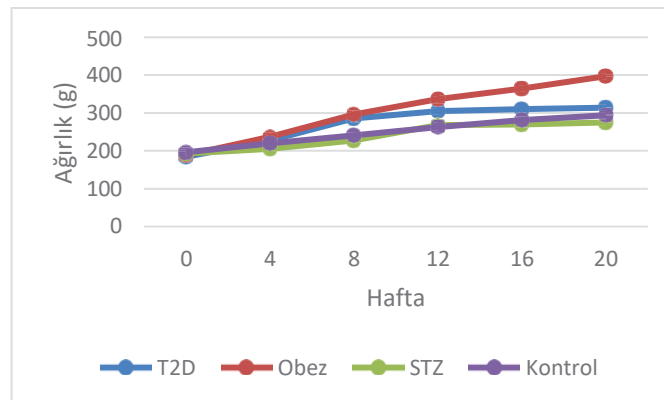
cDNA sentez kiti Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transkriptaz kiti kullanılarak, RNA örneklerinden cDNA sentezi yapılmıştır. Sentezlenen cDNA ürünleri PCR-elektroforez yöntemleri ile kontrol edilmiştir. Uygun reaksiyon bileşenleri, uygun hacimlerde kullanılarak, RNA miktarı 1,5 µg ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada, HNF4A, LMNA, WFS1, ADAMTS9 mRNA ekspresyon seviyelerini incelemek için FAM boyalı prob içeren TaqMan gen ekspresyon analiz kiti kullanılmıştır. Real time PCR için karışıma, 20x TaqMan Gene Expression Assay (1 µl), 2x TaqMan Gene Expression Assay Master mix (10 µl), cDNA örneği (2 µl), nükleaz içermeyen su (7 µl) eklenerek hazırlanmıştır. 96'lık plate'e hazırlanan reaksiyon karışımı, 20'şer µl şeklinde paylaştırılmıştır. Belirlenen ısı döngü koşulları kullanılarak Real time PCR cihazında reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon verilerini değerlendirmek için Threshold Cycle (eşik değer döngü; CT) değerleri arasındaki farklılıklar ölçülerek hesaplanmıştır. İlk anlamlı artışın olduğu noktadaki veriyi yansıtan CT değerleri, her bir grup ve her bir gen için duplike olarak çalışılmış ve ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir. İç kontrol gen olarak, GAPDH (house keeping gen) kullanılmıştır. Kantitatif PCR sonuçları, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre analiz edilmiştir.

Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanılmıştır. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum-maksimum) olarak özetlenmiştir. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alınmıştır. Real time PCR sonuçları, katlı değişimleri (fold change) değerlendirilmiştir.

Bulgular

Bu çalışmada, yüksek yağlı diyet ve streptozotosin enjeksiyonu uygulanarak T2D modeli geliştirilen ratlarda, karaciğer dokusunda kodlanan HNF4A, LMNA, WFS1, ADAMTS9 genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Çalışmanın ilk 4 dört haftalık sürecinde, ağırlık değişimi açısından ortalamalar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmazken ($p>0.05$), çalışmanın 4. dördüncü haftasından itibaren çalışma sonuna kadar (20. hafta) ortalama vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Yüksek yağlı diyet (HFD) (398 ± 10.3 g) ve HFD+STZ (314 ± 23.5 g) gruplarının ortalama vücut ağırlıkları, normal diyet ile beslenen STZ (275 ± 7.3 g) ve kontrol (294 ± 6.1 g) grupları ile kıyaslandığında, deneyin ikinci haftasından itibaren yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda anlamlı bir artış meydana gelmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Gruplarda haftalara göre vücut ağırlığı değişimleri.

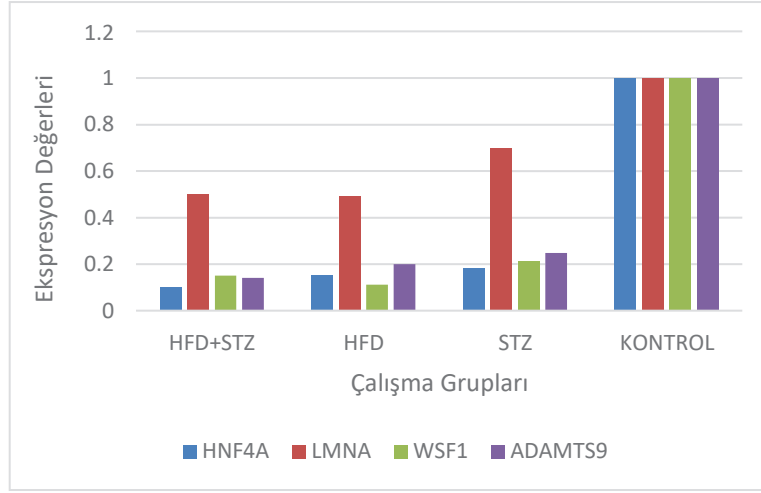
Streptozotosin enjeksiyonu yapılan ve yapılmayan gruplarda, sekizinci haftadan itibaren kuyruk veninden alınan bir damla kan ile kan glikoz düzeyleri ölçüldü. Sekizinci haftadan, yirminci haftaya kadar ki süreçte kan glikoz düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). HFD+STZ ve STZ grubu ratlarda, açlık kan glikoz seviyesi STZ enjeksiyonundan sonra artış göstermiştir. HFD+STZ (387 ± 46.3) ve STZ (369 ± 41.8) grubu ratların ortalama kan glikoz seviyesinde, kontrol grubu ve HFD grubu ratların ortalama kan glikoz seviyesine kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. HFD (137 ± 4.6) ve kontrol (87 ± 5) grubu ratların kan glikoz seviyelerini kendi içinde karşılaştırdığımızda ise, HFD grubu ve kontrol gruplarının kan glikoz seviyelerindeki farkın anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir.

İnsülin tolerans testi sonucunda, açlık kan şekeri düzeyinde meydana gelen azalmanın çok az olması ya da değişiklik olmaması, tip 2 diyabet modelinin geliştirilmesinde başarılı olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda insülin etkisi ile düşmenin, ilk 30 dakikaya kadar devam ettiği, 30 dakika sonucunda glukoneogenez ve glikojenoliz sonucu kan şekeri düzeylerinde düşmenin eski haline döndüğü gözlemlenmiştir. İnsülin tolerans testinde, 30 dakikalık süreç sonucundaki veriler baz alınmaktadır. (Hazman Ö., 2011; Hazman & Çelik., 2014). Yapılan insülin tolerans testine göre, yüksek yağlı yem ile beslenen ve yüksek yağlı yem ve streptozotosin uygulanan gruplarda kan şekerindeki düşme ilk 30 dk'da normal yem ile beslenen gruplara kıyasla daha azdır. Bu gruplarda insülin direnci gözlenmiştir. Kontrol grubu ve sadece streptozotosin uygulanan grupta ise kan glikoz seviyesinin azalma yüzdesi yüksek yağlı diyet ile beslenen gruplara kıyasla daha fazladır. Bu gruplarda insülin direnci gözlemlenmemiştir.

Moleküler Analiz Sonuçları

Streptozotosin ve yüksek yağlı diyet ile insülin direnci ve obezite modeli oluşturduğumuz sıçanlarda, karaciğerde önemli metabolik yollarda bulunan ve diyabet patolojisi ile yakından ilişkili olan HNF4A, LMNA, WSF1, ADAMTS9 genlerinin ifade düzeylerini inceledik. Tüm örnekler için hem hedef genler, hem de referans gen olan GAPDH için Ct değerleri alındı. Sonrasında fold change değerleri $\Delta Ct = Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{referans gen}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muamele edilen}} - \Delta Ct_{\text{kontrol}}$, ekspresyon oranı $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülleri üzerinden hesaplandı. Tüm gruplar, kendi içinde kontrol grupları ile 1'e normalize edilerek hesaplanmıştır.

HNF4A geni açısından, kontrol grubuna kıyasla tip 2 diyabet modeli (HFD+STZ) oluşturulan grupta gen ekspresyonu seviyesinde yaklaşık 10 kat baskılanma, LMNA geninde aynı grupta kontrol grubuna kıyasla yaklaşık iki kat baskılanma, WSF1 geninde yaklaşık 6 altı kat baskılanma, ADAMTS9 geninde yaklaşık yedi kat baskılanma gözlenmiştir. Bu farklılık istatistiksel açıdan önemli değildir. (Şekil 2). Obezite modeli (HFD) geliştirilen grupta kontrol grubuna kıyasla HNF4A gen ifadesinde yaklaşık olarak 6.5 kat baskılanma, LMNA gen ifadesinde yaklaşık iki kat baskılanma, WSF1 gen ifadesinde yaklaşık dokuz kat baskılanma, ADAMTS9 gen ifadesinde yaklaşık beş kat baskılanma gözlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 2). Streptozotosin (STZ) uygulanan ve normal yem ile beslenen grupta ise HNF4A gen ifadesinde yaklaşık olarak 5.5 kat baskılanma, LMNA gen ifadesinde yaklaşık 1.4 kat baskılanma, WSF1 gen ifadesinde yaklaşık 4.7 kat baskılanma, ADAMTS9 gen ifadesinde yaklaşık dört kat baskılanma gözlenmiştir. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 2).



Şekil 2. HNF4A, LMNA, WSF1, ADAMTS9 genlerinin ekspresyon analizi verileri (HFD+STZ: yüksek yağlı diyet+streptozotosin, HFD: yüksek yağlı diyet, STZ: streptozotosin).

Tartışma

Diyabet ve obezite toplumda çok yaygın görülmekte olup, iki hastalık arasındaki yakın ilişkinin temelinde insülin direnci yer alır. Metabolik yollardaki önemli rolleri göz önünde bulundurularak seçilen, karaciğerde protein kodlayan HNF4A, LMNA, WSF1, ADAMTS9 genleri obezite ve diyabette önem arz etmektedir.

Karaciğer hücreleri tarafından üretilen bir glikoprotein olan seks hormonu bağlayıcı globülin (SHBG) ve HNF4A mRNA düzeylerinin ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hepatik trigliserit konsantrasyonu yüksek olduğunda HNF4A ve SHBG ifade düzeylerinin yüksek olduğu, ancak vücut kütle indeksinde artış durumunda HNF4A ve SHBG ifade düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir. Yüksek yağlı diyet uyguladığımız ve vücut kütle indeksinde artış meydana gelen gruplarda, HNF4A ekspresyon seviyesinin diğer gruplara oranla daha düşük seviyede olması yönündeki bulgular bu çalışma ile uyumludur (Şekil 1, Şekil 2) (Winters ve ark., 2014).

Yüksek yağlı diyet ile beslenen ve TNF- α verilen farelerde ve yine TNF- α ile muamele edilen HEP1-6 karaciğer hücre hattında, miR-338-3p'nin ekspresyonunda azalmanın, bozulmuş glikoz toleransı ve insülin toleransı ile ilişkili olduğu ve insülin direncini indüklediği belirlenmiştir. Apoptoz ile ilişkili bir tirozin kinaz olan AATK geninin promotor bölgesine bağlanarak, transkripsiyonunu düzenler. miR-338-3p ise AATK geninin intron bölgesinden kodlanır. Bu çalışmada HNF4A geni susturulduğunda, miR-338-3p ve AATK ekspresyon düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir. Aynı zamanda TNF- α

verilmiş farelerde HNF4A protein seviyesinde azalma olduğu tespit edilmiştir. HNF4A inhibisyonu durumunda, HEP1-6 hücrelerinde insülin sinyal yolağında bozulma ve glikojenezde azalma meydana geldiği rapor edilmiştir (Dou ve ark., 2017). İnsülin direnci gelişen HFD ve HFD+STZ gruplarında HNF4A seviyesinde azalma gözlemlenmesi (Şekil 2), HNF4A'nın insülin yolağındaki rolü dolayısı ile bu çalışmanın bulguları literatür ile uyumludur.

Tip 2 diyabetli hastalarda yapılan bir çalışmada, abdominal subkutan yağ dokuda LMNA mRNA düzeyinin artmış olduğu belirlenmiştir (Miranda ve ark., 2008). Yapılan bu çalışmada, karaciğer dokusunda incelenen LMNA mRNA düzeyi T2D ve obez gruplarda azalmış olarak belirlenmiştir (Şekil 2). Bu uyumsuzluğun nedeninin farklı dokularda çalışılmış olabileceği düşünülmektedir.

Transmembran protein wolframin (WSF1), pankreas beta hücrelerinde hücre bütünlüğünde ve ER homeostazının sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynar. WFS1 genindeki genetik varyasyonların Wolfram sendromu veya tip 2 diyabet ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (Kerékgyártó ve ark., 2013). WSF1 tek nükleotid polimorfizmlerinin insülin duyarlılığı üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, yaygın bir genetik varyant tespit edildi. Bu risk alelini taşıyanlarda GLP-1 kaynaklı insülin salgılanmasının bozulduğu ve tip 2 diyabet riskini artabildiği rapor edilmiştir (Schäfer ve ark., 2009). WSF1 ile ilgili mRNA ve protein düzeyinde literatürde herhangi bir çalışma olmayıp, bu çalışmada da tip 2 diyabet ve obezite modeli ratlarda WS1 mRNA düzeyi kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur (Şekil 2).

Büyük ölçekli genom çapında ilişki çalışmaları (GWAS), tip 2 diyabet ile önemli ölçüde ilişkili 40'tan fazla genomik bölge tanımlamıştır (Greenawalt ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda ADAMTS9 geninin rs4607103 C alelinin, insülin duyarlılığının bozulması yoluyla tip 2 diyabet riskini artırmak için önerilen birkaç gen varyantından birisi olduğu bulunmuştur. Seçici olarak iskelet kasında Adamts9 geni susturulmuş olan farelerin, insülin duyarlılığını arttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, ADAMTS9 aşırı ekspresyonu ile bozulmuş insülin sinyali arasındaki bağlantının, zararlı lipid ara ürünlerinin birikmesinden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (Graae ve ark., 2019). Bu çalışmada, ADAMTS9 geni ekspresyonu yüksek yağlı diyet ile beslenen gruplarda baskılanmış olarak bulunmuştur (Şekil 2) ve çalışma bulguları ile uyumlu değildir.

Sonuç ve Öneriler

Obezite ve tip 2 diyabet modeli oluşturulmuş ratların karaciğer dokusunda eksprese olan ve diyabet patolojisi ile yakından ilişkili aday genlerin mRNA düzeylerinin incelendiği çalışma-ile ilgili literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Literatürde yer alan çalışmalar genellikle polimorfizm temelli olup, ekspresyon ve protein seviyesindeki çalışmalara daha az rastlanmaktadır. Bulgular, insülin direnci, tip 2 diyabet ve obezitenin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Aynı zamanda diyabet patolojisine terapötik yaklaşımda, potansiyel yeni belirteçler olarak HNF4A, LMNA, WSF1, ADAMTS9'un değerlendirilebileceğine işaret etmektedir. Diyabet ve bu aday genler arasındaki ilişkinin anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Etik Kurul Beyanı

Bu çalışmalar için, Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' ndan 24.04.2017 tarihli, 4 sayılı toplantı kararı ile etik kurul onayı alınmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan ederler

Maddi destek

Çalışmamız Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimince TSA-2017-9090 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

Teşekkür

Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, desteklediklerinden dolayı teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33(1), 62-69. <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>
- American Diabetes Association. (2018). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, 41(Supp 1), 38-50. <https://doi.org/10.2337/dc18-S004>
- Ajluni, N., Meral, R., Neidert, A. H., Brady, G. F., Buras, E., McKenna, B., DiPaola, F., Chenevert, T. L., Horowitz, J. F., Buggs-Saxton, C., Rupani, A. R., Thomas, P. E., Tayeh, M. K., Innis, J. W., Omary, M. B., Conjeevaram, H., & Oral, E. A. (2017). Spectrum of disease associated with partial lipodystrophy: lessons from a trial cohort. *Clinical Endocrinology*, 86, 698-707. <https://doi.org/10.1111/cen.13311>
- Arya, V. B., Rahman, S., Senniappan, S., Flanagan, S. E., Ellard, S., & Hussain, K. (2014). HNF4A mutation: switch from hyperinsulinaemic hypoglycaemia to maturity-onset diabetes of the young, and incretin response. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 31(3), e11–e15. <https://doi.org/10.1111/dme.12369>
- Chomczynski, P., Mackey, K. (1995). Short technical reports. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, 9(6), 942-945.
- Dou, L., Wang, S., Sun, L., Huang, X., Zhang, Y., Shen, T., Guo, J., Man, Y., Tang, W., & Li, J. (2017). Mir-338-3p Mediates Tnf- α -Induced Hepatic Insulin Resistance by Targeting PP4r1 to Regulate PP4 Expression. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 41(6), 2419-2431. <https://doi.org/10.1159/000475912>
- Furnes, M. W., Zhao, C. M., & Chen, D. (2009). Development of obesity is associated with increased calories per meal rather than per day. A study of high-fat diet-induced obesity in young rats. *Obesity Surgery*, 19, 1430–1438. <https://doi.org/10.1007/s11695-009-9863-1>
- Gloyn, A. L., Tribble N. D., van de Bunt, M., Barrett, A., & Johnson, P. R. (2008). Glucokinase (GCK) and other susceptibility genes for beta-cell dysfunction: the candidate approach. *Biochemical Society Transactions*, 36, 306-11. <https://doi.org/10.1042/BST0360306>
- Graae, A. S., Grarup, N., Ribel-Madsen, R., Lystbæk, S. H., Boesgaard, T., & Staiger, H. (2019). ADAMTS9 regulates skeletal muscle insulin sensitivity through extracellular matrix alterations. *Diabetes*, 68(3), 502-514. <https://doi.org/10.2337/db18-0418>
- Greenawalt, D. M., Sieberts, S. K., Cornelis, M. C., Girman, C. J., Zhong, H., Yang, X., Guinney, J., Qi, L., & Hu, F. B. (2012). Integrating genetic association, genetics of gene expression, and single nucleotide polymorphism set analysis to identify susceptibility Loci for type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Epidemiology*, 176(5), 423-30. <https://doi.org/10.1093/aje/kws123>
- Hazman, Ö. (2011). *Oral antidiyabetik ilaç sitagliptin'in oksidan-antioksidan denge üzerine etkisinin deneysel Tip 2 diyabet modeli oluşturulan ratlarda araştırılması*. [Yayınlanmış doktora tezi], Afyon Kocatepe Üniversitesi.
- Hazman, Ö., & Çelik, S. (2014). Effects of Oral Anti-diabetic agent sitagliptin on total antioxidant and oxidant status in rats with Type 2 diabetes mellitus. *Journal of Applied Biological Sciences*, 8(1), 31-37
- Ingelsson, E., & McCarthy, M. I. (2018) Human genetics of obesity and Type 2 diabetes mellitus: Past, present, and future. *Circulation. Genomic and Precision Medicine*, 11(6), e002090. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.118.002090>
- International Diabetes Federation (2019). IDF Diabetes Atlas [9th ed]. <https://www.diabetesatlas.org/en/>.

- Javeed, N., & Matveyenko, A. V. (2018). Circadian etiology of Type 2 diabetes mellitus. *Physiology*, 33(2), 138-150. <https://doi.org/10.1152/physiol.00003.2018>
- Kamenov, Z., Higashino, H., Todorova, M., Kajimoto, N., & Suzuki, A. (2006). Physiological characteristics of diabetic neuropathy in sucrose fed Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 28(1), 13-8. <https://doi.org/10.1358/mf.2006.28.1.962772>
- Kerékgyártó, M., Németh, N., Kerekes, T., Rónai, Z., & Guttman, A. (2013). Ultrafast haplotyping of putative microRNA-binding sites in the WFS1 gene by multiplex polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1286, 229-34. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.062>
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28, 412-419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
- Miranda, M., Chacón, M. R., Gutiérrez, C., Vilarrasa, N., Gómez, J. M., Caubet, E., Megía, A., & Vendrell, J. (2008). LMNA mRNA expression is altered in human obesity and type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)*, 16(8), 1742-8. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.276>
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018) Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Reed, M. J., Meszaros, K., Entes, L. J., Claypool, M. D., Pinkett, J. G., Gadbois, T. M., & Reaven, G. M. (2000). A new rat model of type 2 diabetes: The fatfed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*, 49(11), 1390-4. <https://doi.org/10.1053/meta.2000.17721>
- Rhee, E. J. (2019). Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes: an epidemiological perspective. *Endocrinology and Metabolism (Seoul, Korea)*, 34(3), 226–233. <https://doi.org/10.3803/EnM.2019.34.3.226>
- Schäfer, S. A., Müssig, K., Staiger, H., Machicao, F., Stefan, N., Gallwitz, B., Häring, H. U., & Fritsche, A. (2009). A common genetic variant in WFS1 determines impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion. *Diabetologia*, 52(6), 1075-82. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1344-5>
- Vimaleswaran, K. S., & Loos, R. J. (2010). Progress in the genetics of common obesity and type 2 diabetes. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12 (e7),1-27. <https://doi.org/10.1017/S1462399410001389>
- Winters, S. J., Gogineni, J., Karegar, M., Scoggins, C., Wunderlich, C. A., Baumgartner R., & Ghooray, D. T. (2014). Sex hormone-binding globulin gene expression and insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(12), E2780-8. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2640>
- Zeggini, E., Scott, L. J., Saxena, R., Voight, B. F., Marchini, J. L., Hu, T., de Bakker, P. I., Abecasis, G. R., Almgren, P., Andersen, G., Ardlie, K., Boström, K. B., Bergman, R. N., Bonnycastle, L. L., Borch-Johnsen, K., Burtt, N. P., Chen, H., Chines, P. S., Daly, M. J., Deodhar, P., ... Altshuler, D. (2008). Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nature genetics*, 40, 638-45. <https://doi.org/10.1038/ng.120>