

Grelin ve Grelin Reseptörü Polimorfizmlerinin Tip 2 Diyabetle İlişkisi

Relationship of Ghrelin and Ghrelin Receptor Polymorphisms with Type 2 Diabetes

Esmâ SELÇUK^{1*}, Uğur ŞAHİN², Didem ÖZKAHRAMAN¹, Mustafa CALAPOĞLU²,

Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU¹

Ö Z E T

Bir gastrik peptit olan grelin ve onun büyüme hormonu salgılatıcı G protein-bağlı reseptörünün glukoz metabolizması ve enerji homeostazında önemli bir rol oynadığına dair ciddi kanıtlar mevcuttur. Bu nedenle, Tip 2 diyabet için duyarlılık alelleri taşıyan bu genler potansiyel birer aday olarak değerlendirilmektedir.

Isparta yöresinden 75 Tip 2 diyabet hastası ve 25 kontrolden oluşan 100 Türk yetişkin bireyin dahil edildiği vaka-kontrol kesitsel ilişkilendirme çalışması yapıldı. *Grelin* geninde dört promotör (rs26311, rs26312, rs27647, rs3755777) ve bir intronik (rs35683) bölge ve *Grelin reseptöründe* bir intronik (rs509035) ve bir 3'UTR (rs565105) bölge tek nükleotid polimorfizmleri seçilerek Tip 2 diyabet ile ilişkisi Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi sistemi kullanılarak araştırıldı.

Tip 2 diyabet ile iki adet tek nükleotid polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki saptandı: *Grelin* geninin promotör bölgesinde yer alan rs27647 ve intron 1'de bulunan rs35683 (P<0.05).

Sonuç olarak, elde edilen bulgular Isparta yöresinde yaşayan Tip 2 diyabet toplumunda *grelin* polimorfizmlerinin hastalık gelişimine yatkınlık oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Tip 2 diyabet, *grelin*, *grelin reseptörü*, tek nükleotid polimorfizmi, Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi

Alınış / Received: 12.05.2022 Kabul / Accepted: 24. 07.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 31.08.2022



ABSTRACT

There is compelling evidence that the gastric peptide ghrelin and its growth hormone secretagogue G protein-coupled receptor play an important role in glucose metabolism and energy homeostasis. Therefore, these genes carrying susceptibility alleles for Type 2 diabetes are considered as potential candidates.

A case-control cross-sectional association study was conducted in Isparta region, including 75 Type 2 diabetes patients and 100 Turkish adult individuals, including 25 controls. Four promoters (rs26311, rs26312, rs27647, rs3755777) and an intronic (rs35683) region in the ghrelin gene and an intronic (rs509035) and a 3'UTR (rs565105) region in the ghrelin receptor are associated with type 2 diabetes by selecting single nucleotide polymorphisms Matrix Assisted Laser Desorption /Ionization was investigated using the Time of Flight Mass Spectrometer system.

A significant relationship was found between type 2 diabetes and two single-nucleotide polymorphisms: rs27647 in the promoter region of the ghrelin gene and rs35683 in intron 1 ($P<0.05$). In conclusion, the findings suggest that ghrelin polymorphisms may predispose to disease development in the Type 2 diabetes population living in the Isparta region.

Keywords: Type 2 diabetes, ghrelin, ghrelin receptor, single-nucleotide polymorphisms, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer



1. Giriş

En son verilere göre yaklaşık olarak 463 milyon yetişkinin diyabet hastalığından muzdarip olması, bu hastalığın dünya çapında bir sağlık sorunu olduğunu göstermektedir [1]. Diyabet, dünya genelinde önde gelen yedinci sıradaki ölüm nedeni olmasının yanı sıra kalp krizi, felç, böbrek yetmezliği, alt ekstremitte amputasyonu ve körlüğün de önemli bir nedenidir [2]. Tip 2 diyabet (T2DM), diyabet vakalarının %90-95'ini oluşturan en yaygın alt tiptir [3]. Tip 2 diyabet etiyolojisi, genetik ve genetik olmayan faktörlerin etkileşimine dayanmakta olup insülin direnci, obezite ve enerji bozuklukları spektrumu ile karakterize glukoz metabolizması bozukluğudur [4]. Karmaşık 'gen-çevre' etkileşimlerinin, mevcut diyabet pandemisinden sorumlu olduğu bilinmektedir [5, 6]. Tip 2 diyabetin çevresel, davranışsal ve genetik faktörlerin kombinasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak, aile ve ikiz çalışmalarına dayanarak, Tip 2 diyabetin %25 - %72 oranında da kalıtsal olduğu tahmin edilmektedir [7]. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), genetik varyasyonlardır. SNP'ler genellikle tek başına hastalık sebebi olmasa da, kişinin özel metabolik bozukluklara ve dolayısıyla hastalıklara yatkınlığını belirleyebilirler [8].

Grelın, esas olarak midede sentezlenen 28 amino asitlik bir peptittir ve orijinal olarak büyüme hormonu salgılayıcı 1a reseptörünün (GHS-R1a) endojen lıqandı olarak tanımlanmıştır [9]. Grelın tek oreksijenik gastrointestinal peptittir ve ana işlevlerinden biri büyüme hormonu (GH) salgılanmasını uyarmaktır [10]. Grelın biyolojik etkilerinin çoğunu GHS-R1a'ya bağlanarak, serininin 3 pozisyonundaki translasyon sonrası açılasyonu ile gerçekleştirmektedir [11]. İnsanlarda, *ghrelin* (GHRL) gen polimorfizmleri, dengesiz enerji homeostazına bağlı patolojilerle ilişkilendirilmiştir [12]. *Grelın reseptörü* (GHSR) genindeki varyasyonlar obezite, yeme, yeme davranışı, iştah, kan trigliseridi, açlık insülin seviyesi ve insülin direnci ile ilişkilidir [13-15]. Grelın ve reseptörlerinin üretimi ve salgılanması, ilgili genleri tarafından düzenlenirken GHSR promotör aktivitesindeki değişiklikler grelin aktivitesinde azalmaya yol

açabilmektedir [16]. Son zamanlarda, *GHRL* ve *GHSR* genleri ve SNP'leri ile boy, obezite, Tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili çalışmalar yürütülmekte olup ve çalışma sonuçları net bir şekilde yorumlanamamaktadır [16]. Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmalarında (GWAS) 3q24-28 kromozom bölgesinde yer alan *GHSR* lokusunun (3q26.31) da içinde yer aldığı artan obezite ve diyabet riski ile ilişkisi bulunmuştur [17].

Yapılan literatür taraması sonucu, T2DM'nin çevresel faktörlerin yanı sıra çok genli kalıtsal özelliklere yatkınlık içerdiği, *ghrelin* ve *GHSR* genlerinin hastalığa yatkınlık oluşturan genlerden olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda bu genlere ait polimorfizmlerin, Isparta yöresindeki T2DM vakaları ile ilişkisi araştırılmıştır. *Ghrel* ve *GHSR* polimorfizmlerinin farklı etnik gruplar arasında T2DM duyarlılığı açısından farklı etkileşimlerinin olduğu bilinmektedir, şu ana kadar Türk popülasyonunda genotipik ve allelik frekanslar ve bunların T2DM ile ilişkisi hakkında bir kanıt yoktur. Planlanan çalışmada vaka-kontrol çalışma modeli ile *GHRL* ve *GHSR* varyantları ile T2DM ilişkisi Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi sistemi (MassARRAY teknolojisi) (MALDI-TOF MS) kullanılarak ortaya koyulmuştur.

2. Materyal ve Metot

2.1. Çalışma Grubu

Çalışma, vaka-kontrol kesitsel ilişkilendirme çalışması olarak planlandı. Örneklem Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Dahiliye Polikliniğine başvuran 100 bireyden oluşturuldu. Vaka grubunun T2DM tanıları ve oral glukoz tolerans testi sonuçları değerlendirilerek Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre belirlendi [18]. Kontrol grubu ailesel diyabet ve T2DM geçmişi olmayan aynı zamanda glukoz toleransını değiştirdiği bilinen herhangi bir ilaç kullanmayan bireylerden oluşturuldu. Çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 09.07.2015 tarihli ve 151 sayılı kararı ile etik kurul izni alınarak gerçekleştirildi.

2.2. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu, üreticinin protokolüne göre (Qiagen, Hilden, Almanya) DNeasy ekstraksiyon kiti kullanılarak taze periferik kan örneklerinden izole edildi ve konsantrasyonları UV spektrofotometre ile (Shimatzu UV 1601, Japonya) belirlendi.

2.3. SNP Seçimi ve Genotipleme

"Genetics", "Ghrelin signaling", "Type2 diabetes", "SNP", "association", "human" anahtar kelimeleri kullanılarak yayımlanmış çalışmalar PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) ve Web of Science (<http://isiknowledge.com>) veri tabanlarında taranarak, *GHRL* geni promotör bölgesinde yer alan rs26311 (-1062C/G), rs26312 (-994C/T), rs27647 (-604G/A), rs3755777 (-1500C/G) ile intronik bölgesindeki rs35683 (A/C) ile *GHSR* genine ait rs509035 (g.7798C/T, intronik bölge) ve rs565105 (g.9130G/A,G/C,C/T, 3'UTR bölgesi) tek nükleotid polimorfizmleri çalışılmak üzere belirlendi.

Seçilen bu SNP'ler National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) veri tabanındaki bilgiler kullanılarak SpectroDesigner software (Sequenom, San Diego, CA) ile tasarlandı ve genotipleme üretici firmanın talimatlarına göre Sequenom Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi Sistemi (MassARRAY) (MALDI-TOF MS) (Sequenom Inc.) ile gerçekleştirildi. Bu yöntem özetle üç aşamalı bir süreçten oluşmaktadır:

-Multipleks birincil PCR: *Ghrel* ve *GHSR* için 7 farklı genotipinin yüksek verimli 100-pleks analizi olan birincil PCR amplifikasyonu, DNA ekstraksiyonu kalite kontrolü olarak HBB (human β -globin) ile birleştirilmiş, MasScan_HPVP Primer Mix (Sequenom Inc.) kullanılarak 384 kuyulu mikropalaklarda gerçekleştirildi.

-Primer uzantısı: Birincil PCR karışımları, alkalın fosfat ile defosforile edildi ve ardından iPLEX Pro Reaktif kiti ile tek bazlı uzatma reaksiyonu gerçekleştirildi.

-Matris yüklü bir silikon çip dizisinde ürünlerin MALDI-TOF MS ayrımı: Temiz reçine eklenerek tuzdan arındırıldıktan sonra her iPLEX ürünü SpectroChip'e aktarıldı. Veriler SpectroAcquire kullanılarak toplandı ve Mass-ARRAY Typer 4.1.0 yazılımı ile analiz edildi.

2.4. İstatistiksel Analiz

Grelin ve *grelin reseptörü* polimorfizmlerinin ilişkilendirme ve tanımlayıcı analizleri, SNPStats (<https://www.snpstats.net/start.htm>) [19] ve SPSS programı (Version 19.0 for Windows; BM SPSS, IBM, Armonk, NY, USA) kullanılarak yapıldı. Popülasyonlardaki tüm SNP'ler için Hardy-Weinberg dengesi (HWE)'ni sağlamak için genotiplerin frekans dağılımları değerlendirildi. Tüm testler için P değeri <0.05 anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

Çalışılan tüm *grelin* ve *grelin reseptörü* genleri polimorfizmlerinin allel ve genotip frekans dağılımları Tip 2 diyabet hastaları ve sağlıklı bireylerde HWE karşılaştırıldı (Tablo 1).

Tablo 1: *GHRL* genine ait SNP'lerinin vaka ve kontrol gruplarındaki allel ve genotip frekanslarının dağılımı ve T2DM ile ilişkisi

Allel	Tip 2 DM (75)	Kontrol (25)	Genotip	Tip 2 DM (75)	HWE p^1	Kontrol (25)	HWE p^2 değeri
<i>GHRL rs26311</i>							
C	22 (0.15)	10 (0.2)	C/C	1 (0.01)	0,571	1 (0.04)	1,00
G	128 (0.85)	40 (0.8)	G/C	20 (0.27)		8 (0.32)	
			G/G	54 (0.72)		16(0.64)	
<i>GHRL rs26312</i>							
A	4 (0.16)	10 (0.2)	A/A	2 (0.03)	0,945	1 (0.04)	1,000
G	124 (0.84)	40 (0.8)	A/G	20 (0.27)		8 (0.32)	
			G/G	53 (0.71)		16(0.64)	
<i>GHRL rs27647</i>							
C	59 (0.39)	11 (0.22)	C/C	10 (0.13)	0,437	2 (0.08)	0,357
T	91 (0.61)	39 (0.78)	C/T	39 (0.52)		7 (0.28)	
			T/T	26 (0.35)		16(0.64)	
<i>GHRL rs35683</i>							
A	68 (0.45)	17 (0.34)	A/A	11 (0.15)	0,064	5 (0.2)	0,060
C	82 (0.55)	33 (0.66)	C/A	45 (0.61)		7 (0.28)	
			C/C	19 (0.24)		13(0.52)	
<i>GHRL rs3755777</i>							
C	32 (0.21)	11 (0.22)	C/C	1 (0.01)	0,097	2 (0.08)	0,357
G	118 (0.79)	39 (0.78)	G/C	30 (0.4)		7 (0.28)	
			G/G	44 (0.59)		16(0.64)	
<i>GHSR rs509035</i>							
A	32 (0.21)	13 (0.26)	A/A	3 (0.04)	0,631	2 (0.08)	0,747
G	118 (0.79)	37 (0.74)	A/G	26 (0.35)		9 (0.36)	
			G/G	46 (0.61)		14(0.56)	
<i>GHSR rs565105</i>							
G	29 (0.19)	11 (0.22)	T/T	46 (0.61)	0,127	16(0.64)	0,357
T	121 (0.81)	39 (0.78)	G/T	29 (0.39)		7 (0.28)	
			G/G	0		2 (0.08)	

¹vaka grubu Pearson uyum iyiliği (goodness of fit) χ^2 (DF=1)

²kontrol grubu Pearson uyum iyiliği (goodness of fit) χ^2 (DF=1)

Grelin ve Grelin Reseptör Polimorfizmlerinin Tip 2 DM Riski ile Genetik ilişkisi

Grelin Polimorfizmleri:

rs26311 (-1062C/G, promotör) varyantının, eş-baskın, baskın, çekinik ve log-additive kalıtım modellerinde Tip 2 DM ile istatistiksel olarak ilişkili olmadığı belirlenmiştir (Tablo 2). Risk alleli olarak C veya T allelleri, herhangi bir model altında bu varyant için istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip değildir. Fakat C alleleline veya CC genotipine sahip bireyler, GG ve GC genotipine sahip kişilere kıyasla daha yüksek T2DM oluşum riskine sahiptirler (OR = 3.08; p = 0.44). Log additive kalıtım modeli, en düşük AIC (An Information Criterion) değerine sahip olduğu için en uygun model olarak seçilmiştir. Ancak bu model de dahil istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır (OR = 1,48; p> 0.05).

rs26312 (-994C/T, promotör) varyantı değerlendirilen kalıtım modellerinde T2DM ile istatistiksel olarak ilişkili olmadığı Tablo 2'de görülmektedir. AIC değerlerine göre, en uygun kalıtım modeli olarak seçilen dominant modelde GG'ye göre AG ve AA genotiplerinin değerlendirmesinde G allelinin hastalık riskini artırıyor gibi görünmesine rağmen hastalık riski etkisinin çok düşük olduğu belirlendi (OR= 1,36; p= 0,54).

Tablo 2'de, rs27647 (-604G/A, promotör) varyantının resesif model hariç değerlendirilen diğer kalıtım modellerinde T2DM ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişkili olduğu görülmektedir. Baskın kalıtım modeli, en düşük AIC değerine sahip olduğu için en uygun model olarak seçilmiş olup bu modele göre, TT ye göre CC veya TC genotipine sahip olanların T2DM sahip olma riski istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür (OR = 0,30; p = 0.01). Tablo 2'de değerlendirildiğinde C allelinin T2DM için koruyucu rolünün olduğu kanısına varılmaktadır.

rs3755777 (-1500C/G, promotör) varyantı eş-baskın, değerlendirilen kalıtım modellerinde T2DM ile istatistiksel olarak ilişkili bulunmamıştır (Tablo 2). Çekinik kalıtım modeli, en düşük AIC değerine sahip olduğu için en uygun model olarak seçilmiştir. CC genotipine sahip bireyler, GG ve GC genotipine sahip kişilere kıyasla T2DM'e daha yatkındırlar (OR = 6.43; P = 0.12). Fakat tüm uygulanan modeller için CC genotipinin hastalıkla ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır (P>0,05).

rs35683 (A/C, intronik) varyantının ise eş-baskın, baskın, overdominant kalıtım modellerinde T2DM için koruyucu role sahip olduğu istatistiksel olarak ilişkilendirilmiştir (Tablo 2). Overdominant kalıtım modeli, en düşük AIC değerine sahip olduğu için en uygun model olarak seçilmiş ve CC ile AA genotipine sahip bireylerin, CA genotipine sahip kişilere kıyasla T2DM sahip olma riskine istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha çok duyarlı olduğu belirlenmiştir (OR = 0,25; P = 0.0035).

Grelin Reseptörü Polimorfizmleri:

rs509035 (g.7798C/T, intronik) varyantının eş-baskın, baskın, çekinik ve log-additive kalıtım modellerinde T2DM ile istatistiksel olarak ilişkili olmadığı belirlenmiştir (Tablo 2). Çekinik kalıtım modeli, en düşük AIC değerine sahip olduğu için en uygun model olarak seçilmiştir. AA genotipine sahip bireyler, GG ve AG genotipine sahip kişilere kıyasla T2DM yatkınlık oluşturmada daha çok duyarlı olduğu görülmüştür (OR = 2.09; P = 0.45). G allele göre A allelinin hastalık riskini artırmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır (p>0,05).

rs565105 (g.9130G/A,G/C,C/T, 3'UTR bölgesi) varyantının eş baskın kalıtım modeli hariç diğerlerinde T2DM ile istatistiksel olarak ilişkili olmadığı belirlenmiştir (Tablo 2). Vaka grubunda GG genotipine sahip bireyler olmadığından diğer kalıtım modellerinde istatistiksel değerlendirmeler sağlıklı sonuçlar vermemektedir. Hasta ve kontrol grubunun rs565105 varyantının allel frekansları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında iki grup arasında allel frekansları açısından anlamlılık bulunamamıştır (p=0,083). Tablodaki verilere göre, G allelinin T2DM için koruyucu rolü olduğu görülmektedir. Fakat G allelinin koruyucu rolü istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0,05).

Tablo 2: GHRL ve GHSR genlerine ait çalışılan SNP'lerin T2DM ve kontrol grupları arasındaki genotip frekans dağılımları ve istatistiksel değerlendirmesi

SNP	Model	Genotip	Tip 2 DM (n=75)	Kontrol (n=25)	OR (%95 CI)	P	AIC
GHRL rs26311	Eş baskın	G/G	54 (72%)	16 (64%)	1.00	0.63	117.5
		G/C	20 (26.7%)	8 (32%)	1.35 (0.50-3.64)		
		C/C	1 (1.3%)	1 (4%)	3.37 (0.20-57.04)		
	Baskın	G/G	54 (72%)	16 (64%)	1.00	0.45	116.0
		G/C+C/C	21 (28%)	9 (36%)	1.45 (0.55-3.78)		
	Çekinik	G/G+G/C	74(98.7%)	24 (96%)	1.00	0.44	115.9
C/C		1 (1.3%)	1 (4%)	3.08 (0.19-51.21)			
GHRL rs26312	Eş baskın	G/G	53(70.7%)	16 (64%)	1.00	0.81	118.1
		A/G	20(26.7%)	8 (32%)	1.32 (0.49-3.57)		
		A/A	2 (2.7%)	1 (4%)	1.66 (0.14-19.48)		
	Baskın	G/G	53(70.7%)	16 (64%)	1.00	0.54	116.1
		A/G+A/A	22(29.3%)	9 (36%)	1.36 (0.52-3.53)		
	Çekinik	G/G+A/G	73(97.3%)	24 (96%)	1.00	0.74	116.4
A/A		2 (2.7%)	1 (4%)	1.52 (0.13-17.53)			
GHRL rs27647	Eş baskın	T/T	26(34.7%)	16 (64%)	1.00	0.037	111.9
		C/T	39 (52%)	7 (28%)	0.29 (0.11-0.81)		
		C/C	10(13.3%)	2 (8%)	0.32 (0.06-1.68)		
	Baskın	T/T	26(34.7%)	16 (64%)	1.00	0.01	109.9
		C/T+C/C	49(65.3%)	9 (36%)	0.30 (0.12-0.77)		
	Çekinik	T/T+C/T	65(86.7%)	23(92%)	1.00	0.46	115.9
C/C		10(13.3%)	2 (8%)	0.57 (0.12-2.77)			
GHRL rs35683	Eş baskın	C/C	18 (24%)	13 (52%)	1.00	0.011	109.4
		C/A	46(61.3%)	7 (28%)	0.21 (0.07-0.61)		
		A/A	11(14.7%)	5 (20%)	0.63 (0.18-2.25)		
	Baskın	C/C	18 (24%)	13 (52%)	1.00	0.01	109.9
		C/A+A/A	57 (76%)	12 (48%)	0.29 (0.11-0.75)		
	Çekinik	C/C+C/A	64(85.3%)	20 (80%)	1.00	0.54	116.1
A/A		11(14.7%)	5 (20%)	1.45(0.45-4.69)			
GHRL rs3755777	Eş baskın	G/G	44 (58.7%)	16 (64%)	1.00	0.21	115.3
		G/C	30 (40%)	7 (28%)	0.64 (0.24-1.75)		
		C/C	1 (1.3%)	2 (8%)	5.50 (0.47-64.88)		
	Baskın	G/G	44 (58.7%)	16 (64%)	1.00	0.64	116.2
		G/C+C/C	31 (41.3%)	9 (36%)	0.80 (0.31-2.04)		
	Çekinik	G/G+G/C	74 (98.7%)	23 (92%)	1.00	0.12	114.1
C/C		1 (1.3%)	2 (8%)	6.43 (0.56-74.25)			
GHSR rs509035	Eş baskın	G/G	46 61.3%)	14 (56%)	1.00	0.73	117.8
		A/G	26 34.7%)	9 (36%)	1.14 (0.43-2.99)		
		A/A	3 (4%)	2 (8%)	2.19 (0.33-14.45)		
	Baskın	G/G	46 61.3%)	14 (56%)	1.00	0.64	116.2
		A/G+A/A	29 38.7%)	11 (44%)	1.25 (0.50-3.12)		
	Çekinik	G/G+A/G	72 (96%)	23 (92%)	1.00	0.45	115.9
A/A		3 (4%)	2 (8%)	2.09 (0.33-13.27)			
GHSR rs565105	Eş baskın	T/T	46 (61.3%)	16 (64%)	1.00	0.045	112.3
		G/T	29 (38.7%)	7 (28%)	0.69 (0.25-1.89)		
		G/G	0 (0%)	2 (8%)	NA (0.00-NA)		
	Baskın	T/T	46 (61.3%)	16 (64%)	1.00	0.81	116.4
		G/T+G/G	29 (38.7%)	9 (36%)	0.89 (0.35-2.28)		
	Çekinik	T/T+G/T	75 (100%)	23 (92%)	1.00	0.017	110.8
G/G		0 (0%)	2 (8%)	NA (0.00-NA)			

Haplotip Analizi

Grelin ve *Grelin reseptörüne* ait yedi adet SNP için; frekansı 0.01'den büyük olan 16 olası haplotip elde edilmiş, hasta ve kontrol grupları için gözlenen total haplotip frekansları ve istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 3'de verilmiştir. Permütasyon testi sonuçları 12. haplotip serisi hariç diğer tüm haplotip frekanslarının dağılımı T2DM hastaları ve kontroller arasında benzerlik olduğunu göstermektedir (Tablo 3). Yedi adet SNP için G-G-T-C-C-G-G varyantlarına sahip bireylerde T2DM hastalığına sahip olma riski istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir (<0.0001).

Tablo 3. *Grelin* ve *grelin reseptörü* haplotipleri ve Tip 2 DM arasındaki ilişki

Haplotip	SNP*							Frekans	OR (95% CI)	p değeri
	1	2	3	4	5	6	7			
1	G	G	C	A	G	G	T	0.2258	1.00	---
2	G	G	T	C	G	G	T	0.1163	2.94 (0.67 - 12.97)	0.16
3	G	G	T	C	C	G	T	0.0829	4.18 (0.33 - 52.49)	0.27
4	G	G	T	C	C	A	T	0.0672	0.00	1
5	G	G	T	A	G	G	T	0.0636	2.88 (0.41 - 20.44)	0.29
6	C	A	T	C	G	A	T	0.0612	2.41 (0.28 - 20.70)	0.42
7	G	G	C	A	G	G	G	0.0522	0.00	1
8	G	G	T	C	G	G	G	0.0449	6.36 (0.58 - 70.03)	0.13
9	G	G	T	C	G	A	T	0.0402	9.53 (0.67 - 134.57)	0.099
10	C	A	T	C	G	G	T	0.0398	5.91 (0.26 - 136.25)	0.27
11	C	A	T	C	G	G	G	0.0388	2.40 (0.12 - 46.24)	0.56
12	G	G	T	C	C	G	G	0.0249	38 (0,9 – 250,25)	<0.0001
13	G	G	C	A	G	A	T	0.0241	3.92 (0.35 - 43.58)	0.27
14	G	G	C	C	G	G	T	0.02	0.00	1
15	G	G	T	A	C	G	G	0.018	5.78 (0.22 - 155.31)	0.3
16	C	A	T	A	G	G	T	0.01	-	-

SNP: 1 rs26311(-1062C/G, promotör bölge), 2 rs26312(-994C/T, promotör bölge), 3 rs27647(-604G/A, promotör bölge), 4 rs35683(A/C, intronik bölge), 5 rs3755777(-1500C/G, promotör bölge), 6 rs509035(g.7798C/T, intronik bölge), 7 rs565105 (g.9130G/A,G/C,C/T, 3'UTR bölgesi)

4. Tartışma ve Sonuç

Literatür araştırmamız sonucunda grelinin iştah, gıda alımı ve dolaylı olarak da insülin hormonu üzerindeki etkisi göz önüne alındığında, bu peptitde meydana gelen değişimlerin T2DM, adipozite, obezite ve vücut ağırlığına yansıyan patolojik sonuçların kaçınılmaz olduğu sonucuna varılmıştır [20].

Yapılan bir çalışmada, grelinin pankreas β hücrelerinde glukozla uyarılan insülin sekresyonu (GSIS) üzerindeki inhibe edici etkisi araştırılmış ve grelinin (AG) MIN6 insülinoma hücrelerinde 5'-adenosine monophosphate (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz - uncoupling protein 2 (AMPK-UCP2) yolunu aktive ettiği belirtilmiştir. Dahası, bu yolun GSIS'i modüle ettiği ve bu nedenle grelinin insülin sekresyonu üzerindeki inhibitör etkisinin de bu yol aracılığı ile gerçekleştiği ifade edilmiştir [21].

Elabadih ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, grelinin pankreas β hücrelerinin salgı granüllerinde insülin ile birlikte lokalize olduğu ve insülin üretimini arttırdığı belirtilmiş ve diyabetik ratlarda 10^{-6} ve 10^{-12} M grelin uygulanmasının CRL11065 beta hücre hattında insülin salınımını anlamlı olarak artırdığı bildirilmiştir ($p < 0.01-0.04$) [22].

Son zamanlarda, genetik polimorfizmler üzerine yapılan araştırmalar T2DM'nin etiolojisi patoğenezinde bu polimorfizmlerin potansiyel rolünü ortaya koymaktadır [23]. Bazı GWAS çalışmalarında, *GHRL* ve *GHSR* genlerinin bulunduğu 3. kromozomun belirli alanlarının metabolik sendromla dolayısıyla da bu sendromun etiolojisinde rol oynayan adipozite ve diyabet ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. *Grelin* sinyalizasyonu insülin ve glukoz metabolizması yoluyla adipoziteden etkilenebilmektedir. Çalışmaların çoğunda *grelin* geninin ve 5' flanking bölgesindeki polimorfizmler yoğun bir şekilde incelenirken, ekzon 3'te bulunan Leu72Met ve Arg51Gln polimorfizmleri de en çok çalışılan ekzonik SNP'lerdir. Çalışmaların bazıları *grelin* SNP'leri ile T2DM arasında ilişki olduğunu gösterirken bazıları ise negatif sonuçlar ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda diğer çalışmaların aksine *grelin* ve *GHSR* genlerinin kodlanmayan bölgelerinde yer alan SNP'ler çalışmaya dahil edilmiştir. Özellikle çalışmaya dahil ettiğimiz 4 SNP, *grelin* geninin promotör

bölgesinde yer almaktadır (rs3755777; -1500C>G, rs26311; -1062G>C, rs26312, -994C>T ve rs27647; -604G/A). Başlatma sahasının yukarısında yer alan promotör bölge, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Promotör bölgesindeki bir polimorfizm, transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerini değiştirmekte ve dolayısıyla da gen ekspresyonunu etkileyebilmektedir. Bu işlevsel varyantlar, önemli ancak nispeten keşfedilmemiş genetik varyasyon sınıfını temsil ederler [24]. Çalışmamız ile *grelin* geni promotör bölgesinde belirlediğimiz 4 SNP'den sadece -604G/A varyantının T2DM ile ilişkili olduğu bulunmuştur (p<0,01). T2DM ile ilişkili bulduğumuz diğer SNP de intron 1'de yer alan 62G/T varyantıdır (p<0,05). *GHSR* üzerinde belirlediğimiz intronik bölgede lokalize 2 SNP'nin ise T2DM ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05).

Kore kohortunda, akraba olmayan toplam 760 Tip 2 diyabet hastası (yaş: 59 ± 10 yıl, 354 erkek, 406 kadın) ve 641 diyabetik olmayan bireylerin (yaş: 65 ± 4 yıl, 287 erkek, 354 kadın) katılımı ile yapılan bir araştırmada *grelin* genine ait - 1500 C> G (rs3755777), -1062G> C (rs26311), - 994C> T (rs26312), +408C>A (Leu72Met) (rs696217) SNP'leri genotiplenmiş ve Tip 2 diyabet hastalarında bu 4 polimorfizmin genotip dağılımları kontrol grubu ile benzer bulunurken, bu polimorfizmler, özellikle de 1062C alleli yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), açlık plazma glukozu HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) gibi diyabetle ilişkili birkaç fenotip ile de ilişkili bulunmuştur [25].

Mora ve arkadaşları 2015 yılında 413 erkek/411 kadın metabolik sendromlu yaşlı İspanyol popülasyonunda -994CT (rs26312), -604GA (rs27647), -501AC (rs26802), R51Q (rs34911341), M72L (rs696217) ve L90G (rs4684677) *GHRL* polimorfizmlerini incelemişler ve M72L'nin A allelinin, obezite riskini artırırken, -604GA G allelinin ise obezite riskini azalttığı sonucunu elde etmişler. Yine aynı çalışmada -501A/C polimorfizminin AA genotipi ise azalmış vücut kitle indeksi (VKİ) ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bu toplumda çalışılan SNP'lerin sistolik- diyastolik kan basıncı seviyeleri, hipertansiyon, glukoz seviyeleri ve diyabet ile hiçbir ilişkisi bulunamamıştır [26].

Çalışmamız sonucunda T2DM ile ilişkilendirdiğimiz fakat diğer polimorfizmlere göre literatürde hakkında çok daha az çalışmaya rastlanılan *grelin* rs35683 varyantı ise VKİ ile ilişkilendirilmektedir [27, 28].

2017 yılında, Suudi popülasyonunda, 107 T2DM'li ve 101 sağlıklı birey ile *GHRL* rs696217 TG, rs27647 CT, rs2075356 CT ve rs4684677 AT ve *GHSR* rs509030 GC SNP'lerinin analizi yapılmış ve bu SNP'lerin hiçbirisi T2DM, insülin direnci veya plazma grelin seviyeleri ile ilişkilendirilmemiştir [20]. Bizim çalışmamızda ise *GHRL* rs27647 CT genotipi T2DM ile ilişkili bulunmuştur.

grelin rs27647 CT polimorfizminin de dahil edildiği bir diğer çalışmada, *GHRL* ve *GHSR* SNP'lerinin obezite, yeme davranışı ve glukoz metabolizmasıyla bağlantısı araştırılmış, *GHRL* rs4864677 ve *GHSR* rs572169 polimorfizmlerinin obezite ile ilişkili olduğu, *grelin* varyantı rs27647'nin ise insülin salgılanmasını/direncini etkileyebileceği bildirilmiştir [16].

Çalışmamızda *GHSR* rs509035 AA genotipine sahip bireylerin, GG ve AG genotipine sahip olanlara kıyasla Tip2DM'a yatkınlık oluşturmada daha çok duyarlı olduğu görülmüştür (OR = 2.09; P = 0.45). G alleleine göre A allelinin hastalık riskini arttırdığının belirlenmesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşamadığı belirlenmiştir. Çalıştığımız bir diğer *GHSR* varyantı olan rs565105 için vaka grubunda GG genotipine sahip bireyler olmadığından istatistiksel değerlendirmeler sağlıklı sonuçlar vermiş ve bu SNP Tip2DM ile istatistiksel olarak ilişkilendirilememiştir.

GHRL göre çok daha az literatür çalışması mevcut olan *GHSR* polimorfizmlerinin analiz edildiği bir çalışmada, 507 orta yaşlı, aşırı kilolu ve glukoz toleransı bozuk bireylerin katılımıyla, *GHSR*'nin 5' bölgesinde yer alan rs6772676, rs474225, rs490683, rs9819506, ekzon 1'de yer alan rs495225 ve 3' bölgesindeki rs509035 ile rs565105 SNP'lerinin analizi yapılmıştır. Bu çalışmadaki veriler rs490683 ve bizim çalışmamızda da yer alan rs509035 varyantının kilo kaybı ve glukoz metabolizması ile ilişkili bulunurken, *GHSR* geninin promotör bölgesindeki rs490683 ve rs9819506 vücut ağırlığı ve VKİ'deki değişiklik ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamız ile aynı sonucu paylaşan bu literatürde de *GHSR* rs495225 ve rs565105 SNP'leri obezite ve tip 2 diyabet ile ilişkilendirilmemiştir [29].

GHSR rs292216 ve rs509035 genotiplerinin incelendiği ve 78 obez kadından dahil edildiği çalışma ile söz konusu varyantların diyet alımı ile ilişkili olmadığı ortaya konmuştur [30].

Grelin hormonu iştahın düzenlenmesinde, uzun ve kısa dönem enerji homeostasisinde hayati fonksiyona sahiptir. Günümüzde T2DM pandemisi ciddi halk sağlığı sorunudur. Bu çalışma ve diğer yapılan çalışmalar, grelin ve grelin sinyal yolunun T2DM yönetiminde önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. T2DM tedavisinde grelin ve grelin sinyal yolağına karşı geliştirilecek olan antagonistlerin etki faktörlerinin değerlendirmesinde genotipik yapı ve genotipik yapının ortaya çıkardığı fenotipik özellikler son derece önemlidir. Farmakolojik tedavi stratejilerinde bireysel farklılıklara bağlı değişiklikler, uygulanan tedavinin hem etkinliği hem de hasta refahı açısından göz önüne alınması gereken bir

konudur. Kalıtsal yatkınlığı olan T2DM gibi çok faktörlü kompleks hastalıkların hayatın erken döneminde kalıtsal bileşenlerinin belirlenmesi, yaşam tarzı ve çevre faktörüne karşı düzenlemeler yapılabilmesine ve dolayısıyla da T2DM ile mücadelede önemli imkanlar sağlayacaktır.

Sonuç olarak, çalışmamız *GHRL* -604G/A polimorfizminin A allelinin ve +64GT polimorfizminin GT genotipinin Türk toplumuna ait kesit-alanda Tip 2 diyabete karşı koruyucu olduğunu göstermektedir. Fakat çalışmamızda örneklem sayısının düşük olması bu duruma gölge düşürmektedir ve bir ön çalışma olarak dikkate alınması gerekmektedir. Örneklem büyüklüğünün daha fazla olduğu gelecekteki çalışmaların, ilişkiyi tanımlamada oldukça etkili olacağı ve gen-gen etkileşimlerinin de araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 4311-GÜP-15 proje numarası ile desteklenmiştir.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 09.07.2015 tarihli ve 151 sayılı kararı ile etik kurul izni alınarak gerçekleştirildi.

Kaynakça

- [1] International Diabetes Federation 2019. *IDF Diabetes Atlas*, 9th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium.
- [2] World Health Organization 2021. Diabetes. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (accessed on 5 December 2021).
- [3] American Diabetes Association 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37, S81–S90.
- [4] Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2003. *Diabetes Care* 26, S5–S20.
- [5] Loktionov A 2003. Common gene polymorphisms and nutrition: emerging links with pathogenesis of multifactorial chronic diseases. *J Nutr Biochem.* 14(8):426–51.
- [6] Kido, Y. 2017. Gene–environment interaction in type 2 diabetes. *Diabetology international*, 8(1), 7-13.
- [7] Willemssen G, Ward KJ, Bell CG, Christensen K, Bowden J, Dalgard C, Harris JR, Kaprio J, Lyle R, Magnusson PK, Mather KA, Ordonana JR, Perez-Riquelme F, Pedersen NL, Pietilainen KH, Sachdev PS, Boomsma DI, Spector T 2015: The concordance and heritability of type 2 diabetes in 34,166 twin pairs from international twin registers: the Discordant Twin (DISCOTWIN) Consortium. *Twin Res Hum Genet* 18:762–771.
- [8] Costa V, Casamassimi A, Ciccociola A 2010. Nutritional genomics era: opportunities toward a genome-tailored nutritional regimen. *J Nutr Biochem.* 21(6):457–67.
- [9] Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, et al. 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 656–660.
- [10] Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Rio MC, Epelbaum J, et al. 2001 In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 54–61.
- [11] Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL 2008. Identification of the Acyltransferase that Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone. *Cell* 387–396.
- [12] Hassouna R, Zizzari P, Tolle V, 2010. The ghrelin/obestatin balance in the physiological and pathological control of GH secretion, body composition and food intake. *Journal of Neuroendocrinology* 794–804.

- [13] Baessler, A., Hasinoff, M., Fischer, M. 2005. Genetic linkage and association of the growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) gene in human obesity. *Diabetes*. 54:259–67.
- [14] Baessler, A, Fisher, M, Mayer, B. 2007. Epistatic interaction between haplotypes of the ghrelin ligand and receptor genes influence susceptibility to myocardial infarction and coronary artery disease. *Human Molec Genet*. 16:887–99.
- [15] Zavarella, S., Petrone, A., Zampetti, S. 2008. A new variation in the promoter region, the –604 C>T and the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene are associated with the protection to insulin resistance. *Int J Obes*. 32:663–8
- [16] Gueorguiev, M., Lecoœur, C., Meyre, D., Benzinou, M., Mein, C. A., Hinney, A., Froguel, P. 2009. Association studies on ghrelin and ghrelin receptor gene polymorphisms with obesity. *Obesity*, 17(4), 745-754.
- [17] Liu, B., Garcia, E. A., & Korbonits, M. 2011. Genetic studies on the ghrelin, growth hormone secretagogue receptor (GHSR) and ghrelin O-acyl transferase (GOAT) genes. *Peptides*, 32(11), 2191-2207.
- [18] Alberti, K. G. M. M., & Zimmet, P. Z., 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine*, 15(7), 539-553.
- [19] Gueorguiev M, Korbonits M, 2013. Genetics of the ghrelin system. *Endocr Dev. Basel, Karger*, 25, 25–40 (DOI: 10.1159/000348665)
- [20] Joatar F, et al. 2017. Leu72Met and other intronic polymorphisms in the GHRL and GHSR genes are not associated with type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, or serum ghrelin levels in a Saudi population. *Endocrinol Metab* 32:360-369.
- [21] Wang Y, et al. 2010. Ghrelin inhibits insulin secretion through the AMPK–UCP2 pathway in β cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 201; 584, 1503–1508.
- [22] Elabادل H, Hameed R, D'Souza C, Mohsin S, Adeghate E, 2020. Exogenous ghrelin increases plasma insulin level in diabetic rats. *Biomolecules*, 10, 633; doi:10.3390/biom10040633
- [23] Pulkkinen L, Ukkola O, Kolehmainen M, Uusitupa M, 2010. Ghrelin in diabetes and metabolic syndrome. *International Journal of Peptides* Volume Article ID 248948, 11 pages doi:10.1155/2010/248948
- [24] Chorley, B. N., Wang, X., Campbell, M. R., Pittman, G. S., Noureddine, M. A., & Bell, D. A. 2008. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(1-2), 147-157.
- [25] Choi HJ, et al. 2015. Polymorphisms in the ghrelin gene are associated with serum high-density lipoprotein cholesterol level and not with type 2 diabetes mellitus in Koreans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91(11):4657– 4663.
- [26] Mora M, Adam V, Palomera E, Blesa S, Díaz G, Buquet X, et al. 2015 Ghrelin Gene Variants Influence on Metabolic Syndrome Components in Aged Spanish Population. *PLoS ONE* 10(9): e0136931. doi:10.1371/journal.pone.0136931
- [27] Li P, et al. 2014. Genetic association analysis of 30 genes related to obesity in a European American population. *Int J Obes (Lond)*. 38(5): 724–729. doi:10.1038/ijo.2013.140.
- [28] Chung W, et al. 2009. Analysis of 30 genes (355 snps) related to energy homeostasis for association with adiposity in European-American and Yup'ik Eskimo populations. *Hum Hered* 67:193–205.
- [29] Mager U, Degenhardt T, Pulkkinen L, Kolehmainen M, Tolppanen A-M, et al. 2008. Variations in the Ghrelin Receptor Gene Associate with Obesity and Glucose Metabolism in Individuals with Impaired Glucose Tolerance. *PLoS ONE* 3(8): e2941. doi:10.1371/journal.pone.0002941.
- [30] Luglio HF, Inggriyani CG, Huriyat E, Julia M, Susilowati R, 2014. *Int J Mol Epidemiol Genet* 5(4):195-19.