

## **Tip 2 Diabetes Mellitus Hastalarında Sirtuin 1 Gen Ekspresyonu ve Gen Polimorfizminin Rolünün İncelenmesi**

Erhan ÖNALAN<sup>a1</sup>, Nevzat GÖZEL<sup>2</sup>, Murat KARA<sup>3</sup>, Bülent KARAKAYA<sup>4</sup>, Kürşat KARGÜN<sup>5</sup>, Emir DÖNDER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erciş Devlet Hastanesi, İç Hastalıkları, Van, Türkiye

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İç Hastalıkları, Elazığ, Türkiye

<sup>3</sup>Muğla Üniversitesi, Genetik Anabilim Dalı, Muğla, Türkiye

<sup>4</sup>Bingöl Devlet Hastanesi, İç Hastalıkları, Bingöl, Türkiye

<sup>5</sup>Fırat Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksek Okulu Elazığ, Türkiye

### **ÖZET**

**Amaç:** Diabetes Mellitus (DM); İnsülin hormon sekresyonu ve insülin etkisinin azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik metabolizma hastalığıdır. Sirtuin1 (SIRT-1) geni, glukoneogenez geninin indüksiyonunda ve glikolitik genin regresyonunda gereklidir. Yapılan çalışmalara göre SIRT-1 geni iskelet kasında insülin duyarlılığının geliştirilmesinde önemli bir rol oynar.

Bu çalışmada SIRT-1 Gen polimorfizmi ve ekspresyonu ile Tip 2 DM hastalığına yakınlık, tedavide etkinliği ve kontrol arasındaki ilişki araştırılmıştır.

**Materyal ve Metod:** Bu çalışma Elazığ ili civarındaki Tip 2 DM tanısı almış 30 yaş üzeri 40 kişi ve diyabet tanısı olmayan 40 kişilik kontrol grubunda yapıldı. Çalışma gruplarında rutin kan tetkiklerine ek olarak Sirtuin1 (SIRT-1) gen polimorfizmi ve gen ekspresyonu çalışıldı.

**Bulgular:** Çalışmamızda Tip 2 DM (n=40) ve kontrol (n=40) grupları SIRT-1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmleri açısından karşılaştırıldı. SIRT-1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi oranları açısından bu iki grup arasında anlamlı bir fark yoktu (p=0.383). SIRT-1 rs7895833 Single Nükleotid Polimorfizmi ile BMI arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir.(p=0.01-p=0.04).

**Sonuç:** Çalışmamızda SIRT-1 rs7895833 Single Nükleotid Polimorfizmi bölgeleri açısından Tip 2 DM ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Fakat her iki gen ekspresyonu ile Vücut Kitle İndeksi (VKİ) arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Yapılan fonksiyonel çalışmaların yanında SIRT-1'in genetik ve farmakolojik olarak inhibisyonunun insülin direncini indüklemesi gelecekteki yeni nesil farmasötiklerin SIRT-1 ekspresyonunu negatif veya pozitif olarak etkileyen yolakların hedef olarak kullanılacaklarını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Tip 2 DM, SIRT-1 polimorfizm, SIRT-1 ekspresyon

### **ABSTRACT**

#### **The Investigation of the Role of Sirtuin 1 Gene Expression and Gene Polymorphism on the Type 2 Diabetes Mellitus**

**Objective:** Diabetes Mellitus (DM) is a chronic metabolic disease causing disorders in carbohydrate, protein and fat metabolism, which occurs as a result of deficiency in the secretion and effect of the insulin hormone. Sirtuin1 (SIRT-1) is a gene which is necessary for the induction of gluconeogenesis and the regression of the glycolysis gene. The studies in literature report that SIRT-1 gene plays an important role in the development of insulin sensitivity in skeletal muscle. The aim of this study is to evaluate the relationship between SIRT-1 gene polymorphism, expression and the tendency to Type 2 DM, efficiency in the treatment and the control group.

**Material and Methods:** The present study included volunteered 40 patients who live around Elazığ Province, who diagnosed with Type 2 DM and who aged over 30 years (10 male and 10 female who received only oral anti-diabetic treatment and 10 male and 10 female who received no medication) and volunteered 40 individuals in control group (20 male and 20 female) who are aged over 30 years. In addition to routine blood examinations, Sirtuin1 (SIRT-1) gene polymorphism and gene expression were examined in the study groups.

**Results:** The study compared Type 2 DM (n=40) and control (n=40) groups in terms of SIRT-1 rs7895833 gene area polymorphisms. There was no significant difference between these two groups in terms of SIRT-1 rs7895833 area gene polymorphisms rates (p=0.383). Significant correlation was detected between SNP rs7895833 of the SIRT-1 expression, polymorphism and BMI (p= 0.01 – p= 0.04).

**Conclusions:** In conclusion, the study determined no significant difference between Type 2 DM and the control groups in terms of the expression and polymorphism of SIRT-1 rs7895833 SNP areas. However, a negative correlation was determined between the expressions of both genes and BMI. In addition to the functional studies conducted, genetical and pharmacological inhibition of SIRT-1 induces insulin resistance, which indicates that in the future new generation pharmaceuticals targeting the pathways of the Ngn-3 and SIRT-1 expression positive or negatively.

**Key Words:** Type 2 DM, SIRT-1 polymorphism, SIRT-1 expression

<sup>a</sup>Yazışma Adresi: Dr. Erhan ÖNALAN Erciş Devlet Hastanesi, İç Hastalıkları, Van, Türkiye

Tel: 0432 351 96 61/11 25

Geliş Tarihi/Received: 09.12.2014

e-mail: drakdeniz@msn.com

Kabul Tarihi/Accepted: 02.04.2015

**D**iabetes Mellitus (DM); kronik hiperglisemi ile seyreden sistemik kronik bir metabolizma hastalığıdır. İnsülinin kısmen ya da tamamen eksikliği ve / veya

insülin direnci sonucu ortaya çıkan karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması bozukluklarıyla karakterizedir (1,2).

Ülkemizde Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Türkiye Diyabet Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II ) verilerine göre diyabet sıklığının % 13.7 olduğu bildirilmektedir (3). Tip 2 DM'lu hastaların bir kısmının zamanla insüline gereksinim duyması, nadir görülen bazı diyabet tiplerinin tanımlanması ve diyabetin patogenezi ile bilgilerin artması ile 1997 yılında Amerikan Diyabet Birliği (ADA) yeni tanı ve sınıflama kriterlerini yayınlamıştır.

1999'da Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bu kriterleri küçük revizyonlarla kabul etmiştir. Daha sonra 2003 yılında, bozulmuş açlık glukozu (BAG) tanısı için ADA tarafından küçük bir revizyon yapılmıştır. WHO tarafından 2006 yılı sonlarında yayınlanan raporda ise 1999 kriterlerinin korunması benimsenmiştir. Buna karşılık, ADA ve Avrupa Diyabet Çalışma Birliği (EASD) 2007 yılında yayınlanan son konsensus raporlarında ise 2003 yılındaki düzenlemenin değişmemesi gerektiğini savunmaktadır (4-6).

Son olarak 2010 yılında ADA, HbA1c'nin DM tanısında kullanılmasını önermiştir.2010 yılında yeniden düzenlenen ADA'nın diyabet tanısı için belirlediği kriterler Tablo 1' de belirtilmiştir (7).

**Tablo 1. Diabetes Mellitus Tanı Kriterleri**

1. Diyabet semptomlarıyla beraber, günün herhangi bir saatinde veson yenen yemekten sonra geçen zaman dikkate alınmaksızın plazma glukozunun  $\geq 200$ mg/dl ( $\geq 11.1$  mmol/l) olması. (Diyabet semptomları; poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybıdır) veya
2. Açlık plazma glukozunun  $\geq 126$  mg/dl ( $\geq 7.0$  mmol/l) olması. (Açlık; kalori almaksızın geçen en az 8 en fazla 14 saat olarak tanımlanır) veya
3. OGTT'de 2.saat plazma glukozunun  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11.1$  mmol/l) olması. (OGTT; WHO'nun tanımlandığı, 3 günlük yeterli karbonhidrat (150 gr/gün) alınından sonra, açlık durumunda suda çözünen 75 grglukoz ile yapılmalıdır.) veya
4. HbA1c değerinin  $\geq 6.5$  olması (bu test DCCT (DiabetesControl andComplications Trial) tahlili ile standardize edilmiş ve NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) onaylı metodu kullanan laboratuvarlarda yapılmalıdır.)

Yukarıdaki kriterlerden biriyle tanı konulabilir (7). Sirtuinler ile glikoz hemostazı ve insülin sekresyonu arasında ilişkiyi gösteren bilgiler bu proteinlerin insülin direnci ve diyabet oluşumunda etkili olabileceğini göstermektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmada transgenik SIRT-1 overekspresyon yapılan ve yağlı diyet alan hayvanlarda glikoz toleransını arttırdığı gösterilmiştir (8, 9).

Benzer şekilde insanlarda SIRT-1'deki farklı genetik varyasyonlarla enerji tüketimi ve obezite

arasında ilişki tespit edilmiştir (10). Hayvanlarda yapılan çalışmalarda sirtuin aktivatörü resveratrolün diyete bağlı obezite ve glikoz intoleransına karşı koruyucu etkisi olduğu görülmektedir (11). Resveratrol aynı zamanda Adenozin Monofosfat Aktive Protein Kinaz (AMPK)'yı aktive etmektedir. AMPK sirtuin aktivitesi ile yakından ilişkilidir (12).

Bu çalışmada; diyabetik hastalarda, Sirtuin1 (SIRT-1) gen polimorfizmi ve gen ekspresyonunun incelenmesi amaçlandı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nde ve çalışmanın etik onayı, 11.10.2012 tarih ve 01 sayılı kararı alınarak yapıldı. Çalışma öncesi uygulanan güç analizi; Sirtuin1 (SIRT-1) gen polimorfizmi ve gen ekspresyonunun patogenezi ile ilişkisi açısından değışikliği, % 90 güç ile belirleyebilmek için en az 11 olgunun çalışmaya alınmasının yeterli olacağını gösterdi ( $\alpha=0.05$ ,  $\beta=0.1$ ). Çalışma büyüklüğünü toplam 40 olguyu doğru tanı ve tanıyı engelleyen nedenler yönünden değerlendirdik.

Çalışma Fırat Üniversitesi Genel Dahiliye klinik ve polikliniğine müracaat eden en az 6 aydır Tip 2 DM tanısı almış 30 yaş üzeri 40 kişi ve diyabet tanısı olmayan 40 kişilik kontrol grubunda yapıldı. Hasta ve kontrol gruplarındaki katılımcılar çalışma hakkında bilgilendirildi ve yazılı onamaları alındı. Çalışmaya Tip 1 DM tanısı alanlar, 30 yaşından küçük olanlar ve insülin kullananlar alınmadı.

Her iki gruptan 3 ml periferik kan alındı. Kanlar çalışılana kadar -20 derecede saklandı. Malzemeler alındıktan sonra tıbbi genetik laboratuvarında DNA ve RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra Reverz Transkriptaz PCR (RT-PCR) metodu ile SIRT-1 gen polimorfizmine ve gen ekspresyonuna bakıldı. Tip 2 DM hastalığı olanlar her gen polimorfizmi ve gen ekspresyonu için kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Tip 2 DM tanısı olanların vücut kitle indeksi, kan glukozu ve glikolize hemoglobin (HbA1c) değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Bunlar dışında gerekli bilgiler ve laboratuvar parametreleri hasta dosyalarından temin edildi. Sirtuin1 (SIRT-1) gen polimorfizmi ve gen ekspresyonunun patogenezi ile ilişkisi araştırıldı. Veri setinin analizinde SPSS 16 (Statistical Package for the Social Sciences, version 16, SSPS Inc, Chicago, IL, USA) istatistik paket programı kullanıldı. Sayısal verilerin değerlendirilmesinde bağımsız gruplar için T Testi, kategorik değışkenlerin değerlendirilmesinde ise Kİ-KARE testi kullanıldı.  $p<0.05$  değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### SIRT-1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi

Tip 2 DM grubunda (n=40) rs12979860 gen bölgesi için 2 kişi homozigot (C/C), 19 kişi heterozigot (C/T) ve

19 kişi homozigot mutant (T/T) genotipi saptandı. Tip 2 DM tanısı olmayan kontrol grubunda (n=40) ise 2 kişi homozigot (C/C), 20 kişi heterozigot (C/T) ve 18 kişi mutant (TT) saptandı. Bu açıdan her iki grup arasında gen mutasyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=0.974) (Tablo 2).

**Tablo 2.** rs12979860 gen bölgesi polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması ( $\chi^2$  testi)

SIRT-1 rs7895833	C/C		C/T		T/T		Toplam	P
	N	%	N	%	N	%		
Tip 2 DM Olanlar	2	5	19	47.5	19	47.5	40 %100	
Tip 2 DM Olmayanlar	2	5	20	50	18	45	40 %100	0.974
Toplam	4		39		37		80	

### SIRT-1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi ile HbA1c ilişkisi

HbA1c ile SIRT-1 rs7895833 gen bölgesi C/C, C/T, T/T genotipleri açısından Ki-kare testi ile karşılaştırıldığında iki grup arasında bu gen bölgesi polimorfizmleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p=0.645) (Tablo 3).

**Tablo 3.** SIRT-1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi ile HbA1c ilişkisi ( $\chi^2$  testi).

SIRT-1 rs7895833	N	Ortalama	Std. Sapma	P
C/C	5	6.7800	1.43422	
C/T	38	6.1842	1.57764	0.645
T/T	37	6.1027	1.45650	
Toplam	80	6.1838	1.50404	

SIRT-1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi-obez olan ve obez olmayanlarla ilişkisi

Obez olmayanların sayısı 54 ve obez olanların sayısı 26 idi. Obez olan ve obez olmayanların SIRT-1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyleri ortalamaları T-testi ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görüldü (p=0.01) (Tablo 4).

**Tablo 4.** SIRT-1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi obez olan ve obez olmayanlarla ilişkisi (T-test).

SIRT-1 rs7895833	N	Ortalama	Std. Sapma	P
Obez olan	26	0.2462	1.25514	
Obez olmayan	54	2.2698	2.70207	0.01

### TARTIŞMA

Diabetes Mellitus (DM) insülinin kısmen ya da tamamen eksikliği ve/veya insülin direnci sonucu ortaya çıkan karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması bozukluklarıyla karakterize hiperglisemi ile seyreden sistemik kronik bir metabolizma hastalığıdır (1, 2).

Ülkemizde Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Türkiye Diyabet Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II) verilerine göre diyabetik sıklığının %13.7 olduğu bildirilmektedir (3).

Sirtuinler ile glikoz homeostazı ve insülin sekresyonu arasında ilişkiyi gösteren bilgiler bu proteinlerin insülin direnci ve diyabet oluşumunda etkili olabileceğini göstermektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmada transgenik SIRT-1 overekpresyon yapılan ve yağlı diyet alan hayvanlarda glikoz toleransını artırdığı gösterilmiştir (13, 14).

Bazı çalışmalarda SIRT-1 miktarında ılımlı artışın bazal enerji homeostazı üzerinde farklı etkileri olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu fonksiyonel çalışmaların yanında SIRT-1'in genetik ve farmakolojik olarak inhibisyonunun insülin direncini indüklediği görülmüştür. Bu bilgi bize sirtuinin aktivitesindeki manipulasyonlarla metabolik bozuklukların önlenmesinde kullanabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde insanlarda SIRT-1'deki farklı genetik varyasyonlarla enerji tüketimi ve obezite arasında ilişki saptanmıştır (10).

Memelilerde kan glikoz konsantrasyonu farklı fizyolojik durumlarda dar bir aralıkta tutulmaya çalışılır. Açlık durumunda serum glikozunun belirtilen düzeyi hepatik glikoneogenez ile sağlanmaktadır. Sürdürülen çalışmalar sirtuinlerin bu fizyolojik adaptasyonda rol aldığını göstermektedir. Peroxisome proliferator – activated receptor gama-coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) SIRT-1 bağımlı deasetilasyon için bir hedef gözükmemektedir (15). Bu koaktivatör karaciğerde glukoneogenezin düzenlenmesi ile yağ asidi oksidasyonunda esas rolü oynamaktadır. PGC-1 $\alpha$  bu iki yol üzerindeki düzenleyici rolü için sirtuinlere gereksinim duymaktadır (16). Kısa süreli (< 6 saat) ve uzun süreli (> 18 saat) açlık durumlarında protein asetilasyonu ve sirtuin deasetilasyonunun karaciğerin oluşturduğu yanıtın düzenlenmesindeki farklı rolleri incelenmiştir (17).

Bizim çalışmamızda obez olmayanlar (n = 54) ve obez olanlar (n = 26) SIRT-1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Obez olan ve obez olmayanların SIRT-1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyleri ortalamaları T-test ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu gözlemlendi ve SIRT-1 ekspresyonunun VKI ilişkili olduğu saptandı (p = 0.01).

Sonuç olarak; SIRT-1 rs7895833 SNP bölgesi ekspresyonu ve polimorfizmi açısından Tip 2 diyabeti olanlar ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmadı, fakat sirtuin 1 gen ekspresyonu ile BMI arasında ilişki saptandı. Yapılan fonksiyonel çalışmaların yanı sıra SIRT-1'in genetik ve farmakolojik olarak inhibisyonunun insülin direncini indüklemesi yeni nesil farmasotiklerin SIRT-1 ekspresyonunu etkileyen yolları hedef olarak kullanacağını göstermektedir (18, 19).

**KAYNAKLAR**

1. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2005; 28: 37- 42.
2. Diagnosis and classification of diabetes mellitus *Diabetes Care* 2007; 30: 42-47.
3. Satman İ, Alagöl F, Ömer B, ve ark. Diyabet Çalışma Grubu, Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II) Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi Özet Kitabı, 2010: 74.
4. Burant CF. Tip 2 Diyabetin Tedavisi. Amerikan Diyabet Cemiyet'i. Uzel B (çevirmen) s. 3-15, İstanbul: Sigma Publishing Danışmanlık ve Organizasyon, 2004: 3-15.
5. American Diabetes Associations. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27: 5-10.
6. Bennett Peter H, Knowler WC. Joslin Diabetes Mellitus. Yumuk V (Çeviri Editörü), Tanyolaç S (Çeviren), İstanbul Medikal Yayıncılık, 2008: 331-338.
7. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011; 34: 62-69.
8. Banks AS. Sirt1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* 2008; 8: 333-341.
9. Pfluger PT, Herranz D, Velasco Miguel S, Serrano M, Tschop MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 9793-9798.
10. Weyrich P. SIRT1 genetic variants associate with the metabolic response of Caucasians to a controlled lifestyle intervention the TULIP Study. *BMC Med Genet* 2008; 9: 1186.
11. Lagouge M. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1a. *Cell* 2006; 127: 1109-1122.
12. Canto C. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD1 metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 2009; 458: 1056-1060.
13. Bordone L. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *Plos Biol* 2006; 4: e31.
14. Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett* 2008; 582: 46-53.
15. Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1a. *Biol Chem* 2005; 280: 16456-16460.
16. Rodgers JT. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1a and SIRT1. *Nature* 2005; 434: 113-118.
17. Liu Y. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/ coactivator exchange. *Nature* 2008; 456: 269-273.
18. Lynnn FC, Skewes-Cox P, Kosaka Y, Mc Manus MT, Harfe BD, German MS. Micro RNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* 2007; 56: 2938-2945.
19. Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N. The ectopic expression of Pax4 in the Mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell* 2009; 138: 449-462.