

T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK

SU VE GLİSEROL KANALI AKUAPORİN 7 VE 9'UN
DİYABETİK VE/VEYA OBEZ HASTALARDA GEN
POLİMORFİZMLERİ

(Doktora Tezi)

Referans no: 448965

Orkide PALABIYIK

EDİRNE 2012

T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK

SU VE GLİSEROL KANALI AKUAPORİN 7 VE 9'UN
DİYABETİK VE/VEYA OBEZ HASTALARDA GEN
POLİMORFİZMLERİ

(Doktora Tezi)

Orkide PALABIYIK

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2011-115

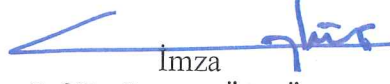
Tez No :

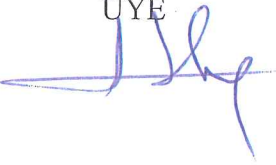
EDİRNE 2012

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü


ONAY


Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve Prof.Dr. Levent ÖZTÜRK danışmanlığında doktora öğrencisi Orkide PALABIYIK tarafından tez başlığı “Su ve gliserol kanalı akuaporin 7 ve 9’un diyabetik ve/veya obez hastalarda gen polimorfizmleri” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 14/11/2012 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Doktora Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

İmza 
Prof.Dr. Levent ÖZTÜRK
JÜRİ BAŞKANI

İmza
Prof.Dr.Hüsniye BİRMAN
ÜYE


İmza
Do.Dr.Selma Arzu VARDAR
ÜYE


İmza
Doç.Dr. Tammam SİPAHİ
ÜYE


İmza
Yrd. Doç. Dr. Mevlüt YAPRAK
ÜYE


Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü V.

TEŐEKKÜR

Doktora eğitimimin başından itibaren her konuda yardımları ve desteğiyle bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, bilimsel, akademik ve etik olarak, yol gösterici olan Sayın Hocam Prof. Dr. Levent ztürk'e, değerli katkılarıyla çalışmaların tüm evrelerinde yardımcı olan, Tez İzleme Komitesi yeleri Doç. Dr. Tammam Sipahi ve Doç. Dr. Arzu Vardar'a, Doktora eğitimi konusunda beni yönlendiren Sayın hocalarım Prof. Dr. Ferda zdemir'e, Prof. Dr. Kadir Kaymak, Prof. Dr. Seralp Şener'e, çalışmadaki gruplarının oluşturulmasında yardımcı olan Doç. Dr. Sibel Güldiken'e Fizyoloji ve Biyofizik Anabilim Dallarında görev yapan tüm hocalarıma, örneklerin çalışılmasını sağlayan Merkez ve Hormon Laboratuvarı çalışanlarına, sevgili eşim Onur Palabıyık'a, arkadaşlarıma ve aileme teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
KAN GLUKOZUNUN DÜZENLENMESİ	4
DIYABETİN TANIMI	13
OBEZİTENİN TANIMI	17
AKUAPORİNLER	19
GEREÇ VE YÖNTEMLER	36
BULGULAR	46
TARTIŞMA	57
SONUÇLAR	63
ÖZET	66
SUMMARY	68
KAYNAKLAR	70
ŞEKİLLER VE TABLOLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	80
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
AQP	: Aquaporin
BGT	: Bozulmuş glukoz toleransı
BKİ	: Beden Kitle İndeksi
CHIP28	: Kanala bağımlı İntegral Protein 28 (Channel-forming Integral Protein 28)
DM	: Diabetes Mellitus
DSÖ	: Dñnya Sağlık Örgütü
FFA	: Serbest yağ asidi (Free Fatty Acid)
GH	: Büyüme hormonu (Growth hormon)
GLUT	: Glukoz için taşıyıcı protein
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
IRE	: İnsülin response element
IRS	: İnsülin-reseptör substratları
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
NPA	: Asparajin-prolin-alanin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide polymorphism)
T2DM	: Tip II Diabetes Mellitus
TG	: Trigliserid
Tm	: Erime sıcaklığı (melting temperature)

GİRİŞ VE AMAÇ

Obezite, endüstrileşmiş ülkelerde oldukça yaygın olarak görülen, çevresel ve genetik faktörlerin etkilediği multifaktöriyel bir hastalıktır. Halen dünyada 250 milyon obez yetişkin ve en az 500 milyon da aşırı kilolu insan bulunduğu tahmin edilmektedir (1). Obezite ve aşırı kilolu vakaların prevalansındaki bu artışın nedeni olarak, beslenmede yüksek enerjili besinlerin tüketilmesi, günlük kişisel işlerde ve mesleki aktivitelerde harcanan enerjinin azalması görülmektedir (2,3). Obezitede artmış morbidite ve mortalite riskine yol açan metabolik değişiklikler obez kişilerin adipoz dokularında ortaya çıkan fonksiyonel değişikliklerle belirlenmektedir. Adipoz dokunun bir endokrin organ olarak fonksiyon gösterdiği ve farklı metabolik yolların düzenlenmesinde rol oynadığını gösteren bulgular giderek artmaktadır (4).

Tip 2 Diabetes Mellitus hastalığı (T2DM), Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) tahminlerine göre 2025 yılında dünyada 300 milyon kişiyi etkileyecek olan, pankreasın β hücrelerinden salgılanan insülin hormonunun sekresyonunun, normal hatta normalden yüksek olması ve/veya periferik insülin kullanımında direncin varlığı sonucu oluşan, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasının bozuklukları ile karakterize bir hastalıktır (5,6).

Su, tüm canlılarda en fazla bulunan ve canlı için vazgeçilmez bir moleküldür. Su kanalları (akuaporinler) su moleküllerinin hücre membranı üzerinden hızlı hareketinden sorumludur. Memelilerin tüm hücre tiplerinde bulunan akuaporinlerin günümüzde 13 üyesi (AQP0-12) tanımlanmıştır (7). Bu kanallardan AQP3, AQP7, AQP9 ve AQP10 membranlardan gliserolün de geçişini sağladığı için akuagliseroproteinler olarak

adlandırılırlar. Gliserol üretimi ve yağ dokusundan dışarı karaciğere akışı lipid ve glukoz homeostazinin anahtar düzenleyicisidir. Bu yağ dokusunda AQP7 ve karaciğerde AQP9 ifadesi ile sağlanmaktadır (8). Yağ dokusunda AQP7 ifadesinin diğer dokulardan daha fazla olduğu, ayrıca testis, epididim, gastrointestinal kanal, iskelet kası, kalp, böbrek ve iç kulakta da bulunduğu gösterilmiştir (9,10). AQP7 ifadesinin fonksiyonel eksikliği ile obezite ve T2DM hastalığı arasında ilişki olduğu kanıtlanmıştır. Yağ dokusunda AQP7 ifadesinin insülin ile baskılandığı, epinefrin ile arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Açlık veya uzun süreli egzersizde yağ dokusundaki trigliseridler hidrolize olur. Açığa çıkan serbest yağ asitleri ve gliserol dolaşıma salınır. Gliserolün hücre membranından geçişi AQP7 aracılığı ile olur. AQP7 ifadesinin açlıkta arttığı, toklukta azaldığı görülmüştür (10). Yağ dokusunda AQP7 geni silinmiş (AQP7-KO) fareler geliştirilmiş ve analiz edilmiştir. AQP7 KO fareler yaşamlarının ilk 16 haftasında kontrol grubu ile benzer vücut ağırlığına sahipken; yaşları ilerledikçe gıda alımları kontrol grubundaki sıçanlara göre aynı olmasına rağmen vücut ağırlığının ve yağ dokusu kitlesinin arttığı gözlenmiştir. AQP7 delesyonunda trigliserid sentez ve yıkım hızının etkilenmediği, yağ dokusu gliserol ve trigliserid içeriğinin, gliserol kinaz aktivitesinin arttığı ancak yağ hücresinden gliserol salınımının 3 kat azaldığı bildirilmiştir (11). Membranın gliserol geçirgenliğinin azalması hücre içi gliserol konsantrasyonunun artmasına ve normal yağ dokusunda aktivitesi çok düşük olan gliserol kinazın uyarılması ile gliserol-3-fosfat oluşumunun artmasına yol açmaktadır. Doku içi seviyesi artan gliserol-3-fosfat, trigliserid sentezinde substrat olarak kullanılmakta ve ilerleyici trigliserid birikimine yol açmaktadır (12).

İnsan AQP9 ifadesinin karaciğer, dalak, lökosit ve akciğerlerde bulunduğu gösterilmiştir (13,14). İmmunohistokimyasal çalışmalar AQP9'un sinüzoidal plazma membranında lokalize olduğunu göstermiştir. Lipoliz ile yağ dokusundan salınan gliserol karaciğere geçer ve glukoneogenez için substrat olarak kullanılır. AQP9'un karaciğerde ki tek gliserol kanalı olduğu düşünülmektedir (14).

Kişilerin genetik yapılarındaki küçük farklılıklar Tek nükleotid polimorfizm "Single Nucleotide Polymorphism" (SNP) aynı çevresel faktörler için, bireylerde değişik sonuçlar doğmasına yol açtığı gözlenmektedir. Bunlar fizyolojik fonksiyonlara etki ederek bireyler arasında hastalıklara karşı değişik yatkınlık düzeyleri oluşturmaktadır. Bu nedenlerle çalışmamızda yağ dokusunda gliserol çıkışını sağlayan AQP7'nin gen ifadesinde (rs4008659) ekson 4'de 347.nükleotid (G→C) transmembran alanında bulunan V59L, promotor bölgelerinde nükleotid değişimi ile saptanan (rs2989924) (A/G) A953G

polimorfizmlerinin ve gliserolün karaciğer hepatositlerine girişini sağlayan AQP9'un (rs 77284866) (T→ G) C43T ve (rs 1867380) (A→G) T279A, polimorfizmlerinin obez ve/veya T2DM'lu olgulardaki etkilerinin incelenmesi, ayrıca kontrol ve hasta olgularından alınacak plazma serum örneklerinde insülin ve gliserol düzeylerinin ölçülmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

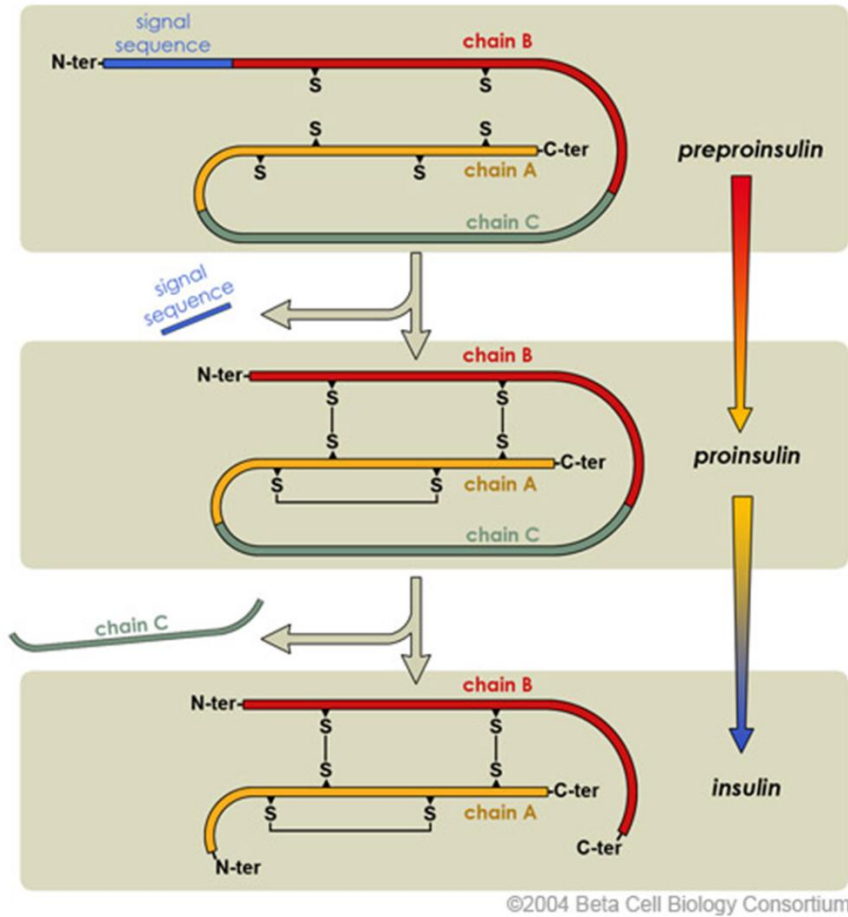
KAN GLUKOZUNUN DÜZENLENMESİ

Kan glukoz düzeyleri beslenme ve açlık durumuna göre değişiklik göstermektedir. Sağlıklı bir insanda 8-10 saatlik bir açlıktan sonra kan glukoz konsantrasyonu genelde 70-100 mg/dL arasında değişir. Gıda alımını takiben gastrointestinal kanalda meydana gelen emilim sonucu genel kan dolaşımındaki konsantrasyonu 120-140 mg/dL'ye çıkabilir. Ancak regülasyon sistemlerinin devreye girmesiyle yaklaşık 2 saat içerisinde tekrar açlık kan glukozu değerlerine iner. Tokluk durumunda karbonhidrat ağırlıklı bir beslenmeden sonra dahi kan glukoz düzeyi 140 mg/dL üzerinde bir değere çıkmaz. Öğünler arasında veya daha uzun süreli açlıklarda da kan glukoz düzeyi normal sınırlarda tutulur. Bu durum, organizmanın kan glukoz düzeyini normal sınırlarda tutmak için güçlü bir düzenleme sistemine sahip olduğunu gösterir. Beyin, eritrosit, retina gibi enerji kaynağı olarak glukozu kullanan organlar için bu düzenleme çok daha önemlidir. Kan glukoz düzeylerinde normal sınırların dışında azalma (hipoglisemi) veya artma (hiperglisemi), ozmotik değişiklikler sonucu organizmaya zarar verebilir (15). Kan glukoz düzeyinin normal sınırlar içinde tutulması kana glukoz sağlayan kaynaklar ile glukoz kullanan olaylar arasında dengeye bağlıdır ve bu denge hormonlar tarafından sağlanır. Bu dengeyi sağlayan hormonlar iki grupta toplanır:

1. İnsülin hormonu ile tokluk durumunda kan glukozunun düzenlenmesi.
2. İnsülin karşıtı sistem tarafından açlık durumunda kan glukozunun düzenlenmesi.

Tokluk Durumunda Kan Glukozunun Düzenlenmesi: İnsülin Hormonu

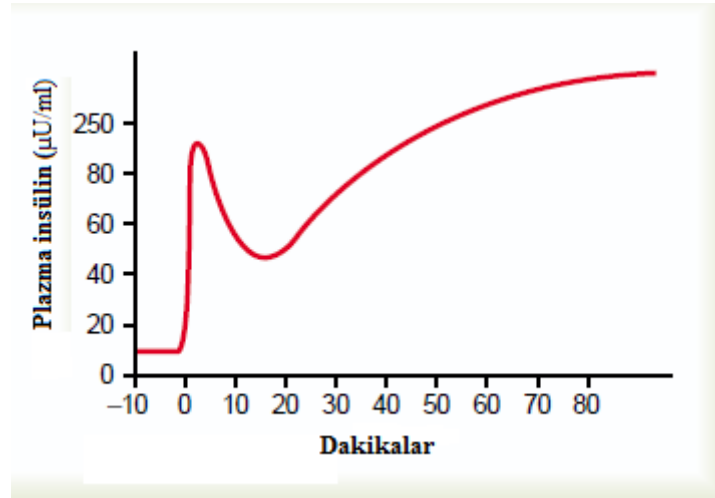
Yemek sonrasında absorpsiyon döneminde pankreasın *Langerhans* adacıklarında bulunan β hücrelerinden insülin salgılanır. İnsülin kan glukoz düzeyinin aşırı artmasını önler. Yapısında 21 ve 30 amino asit içeren iki (A ve B) zincire sahiptir. Zincirler arasında disülfid bağları bulunur. Hormon pre-proinsülin olarak granüllü endoplazmik retikulum üzerinden ribozomlarda sentezlenir. Endoplazmik retikulum kanallarında, polipeptit zincirler birbiri üzerine rotasyon yaparak bağlanır. Sinyal peptitinin enzimlerle kırılmasından sonra proinsülin olarak Golgi aygıtına gelir. Proinsülin, A ve B zincirleri ile onları birleştiren C peptit parçasından oluşur. Meydana gelen proinsülin golgi aygıtında proteazların etkisi ile C peptit segmentini kaybeder. C peptitini kaybeden insülin, çinko iyonu ile veziküllerde depolanır (Şekil 1).



Şekil 1. İnsülin sentezi (16)

Proinsülinin %95'i insüline çevrilir. İnsan pankreası günde ortalama 40-50 ünite insülin üretmektedir. Bu miktar, bezde depolanan hormonun %15-20'sini oluşturur. Kan

glukoz konsantrasyonu aniden normalin 2-3 katına yükselir ve bu düzeyde kalmaya devam ederse, insülin sekresyonu iki evrede belirgin şekilde yükselir: 1. kan glukozunun akut yükselmesini izleyen 3-5 dakika içinde plazma insülin konsantrasyonu, hemen hemen 10 kat artar. Bunun nedeni, depo edilen insülinin derhal kana boşaltılmasıdır. Ancak, başlangıçtaki bu yüksek salgı hızı sürdürülemez ve insülin konsantrasyonu 5-10 dakika içinde normal düzeyin yarısına kadar gerileme gösterir. 2. Yaklaşık 15 dakika sonra, insülin salgısı ikinci kez artma gösterir ve 2-3 saatte yeni bir platoya erişilir. Bu defaki salgı hızı başlangıç fazından daha büyüktür. Bu salgının nedeni, hem daha önceden üretilmiş olan insülinin eklenmesi ve hem de hücrelerde yeni insülin sentezleyen ve serbestleyen enzim sisteminin aktive edilmesidir (Şekil 2).



Şekil 2. Kan glukoz düzeyinde normal sınırın 2-3 katına çıkan ani bir artış sonrası plazma insülin konsantrasyonunda gözlenen artış (17)

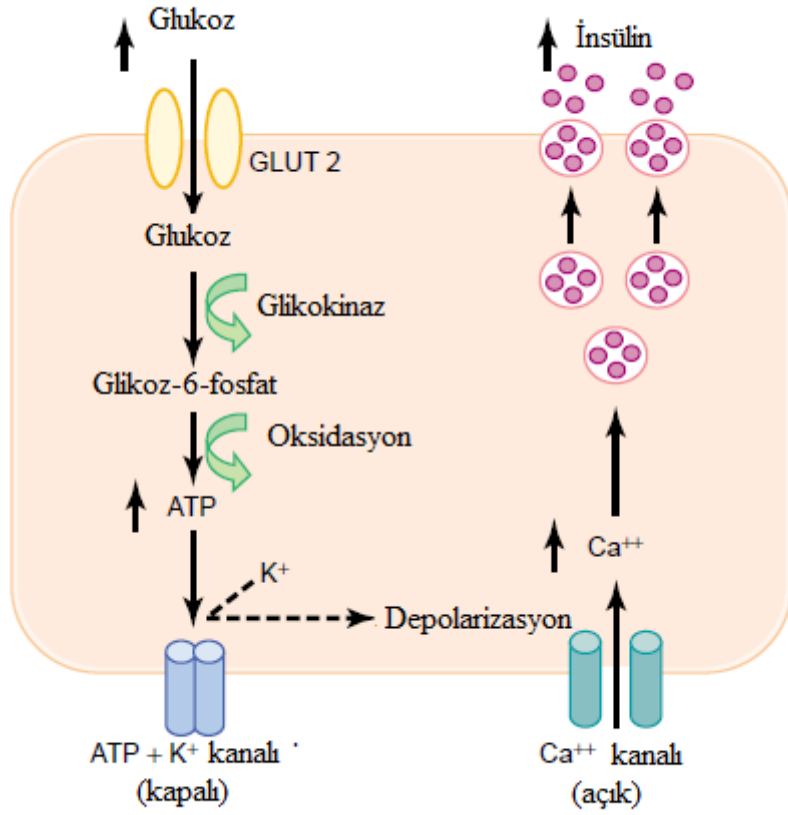
İnsülin sekresyonu β hücrelerinden mikrotübül-mikroflaman sisteminin yer aldığı enerji gerektiren bir sistemle oluşur. İnsülinin salınımında en önemli faktör, ATP-bağımlı K^+ kanallarıdır. İnsülin salınması için ATP'nin varlığı önemlidir. Glukoz hücre içine kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcıları ile taşınmaktadır. Kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcıları bütün hücrelerin yüzeyinde vardır. Vücutta glukoz taşınımı yalnız insülin etkisiyle olmaz. İnsülin uyarısına gerek duymayan birçok taşıyıcı tipi mevcuttur. Kolaylaştırılmış difüzyon sistemi enerji gerektirmeyen, glukoz için taşıyıcı proteinler (GLUT) aracılığı ile olan pasif bir transport sistemidir (6) (Tablo 1).

Tablo 1. Farklı dokularda yerleşmiş glukoz taşıyıcı proteinler (6)

GLUT	BULUNDUĞU YER	K_m (mM)	SUBSTRAT
GLUT-1	Dokuların çoğunda bulunur ve bütün hücrelerin temel glukoz taşıyıcısıdır. Eritrosit, plasenta, fibroblast ve kan beyin bariyerindeki hücrelerin ana taşıyıcısıdır.	1	Glukoz
GLUT-2	Karaciğer, pankreas β hücrelerinde, böbrek ve ince bağırsak epitelyum hücrelerinde bulunur.	15	Glukoz
GLUT-3	Nöron hücrelerinde, plasenta labirent ve retina hücrelerinde bulunur.	1	Glukoz
GLUT-4	İskelet kası, kalp kası ve yağ dokusunda bulunur.	5	Glukoz (İnsülin res.)
GLUT-5	İncebağırsak, böbrek ve testiste bulunur.	6	Fruktoz, Glukoz

GLUT: Glukoz için taşıyıcı proteinler. **K_m** = Taşıyıcı kanalların glukoz geçirgenliğini gösteren standart katsayı.

Şekil 3'te gösterildiği gibi pankreasın β hücrelerine GLUT2 aracılığıyla giren glukoz glukokinaz enzimi ile yıkılır ve hücre içinde ATP düzeyi yükselir. Bu durum ATP-bağımlı K^+ kanallarını kapatarak depolarizasyona neden olur. Depolarizasyon membrandaki voltaj-bağımlı Ca^{+2} kanallarını açarak, hücre dışı sıvıdan içeriye Ca^{+2} girmesine neden olur. Hücre içine giren Ca^{+2} insülinin depo edildiği vezüküllerin hücre zarıyla kaynaşmasına ve hücre dışı sıvıya ekzositozla insülin sekresyonuna neden olur (17).

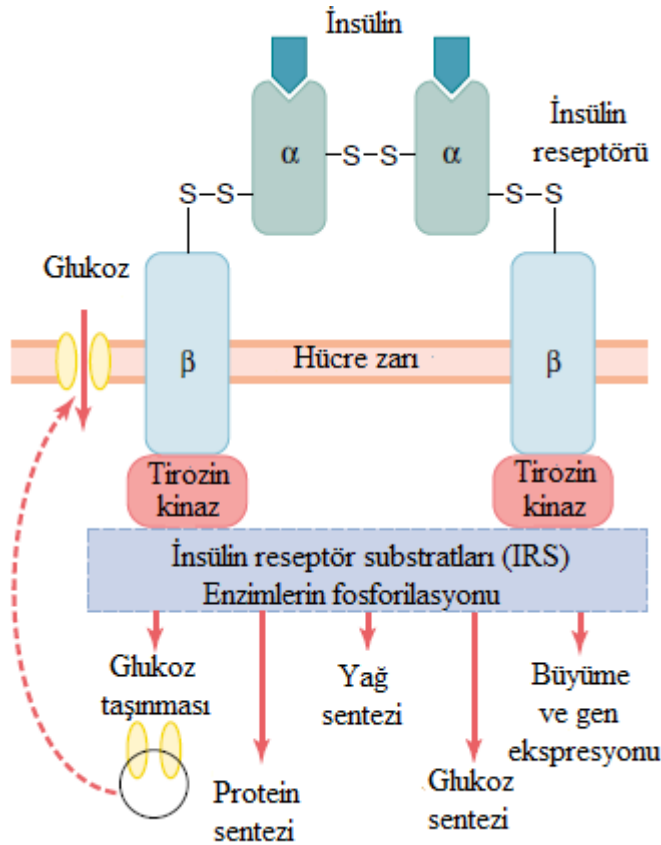


Şekil 3. Pankreastan insülin salgılanmasının mekanizması (17)

İnsülin salgılanmasını uyaran faktörler: 1. Kan glukozunun artması (en önemli uyarandır), 2. Proteinle beslenme, özellikle lösin, arginin, lizin aminoasitlerinin yüksek kan düzeyleri, 3. Gastrik inhibitör peptit (GİP), kolesistokinin, sekretin, gastrin, vazoaktif intestinal polipeptit (VİP), glukagon gibi hormonların aşırı artışı, 4. β -adrenerjik agonistler, 5. Büyüme hormonu (GH), kortizol, plasental laktojen, östrojen ve progesteronun uzun süreyle aşırı düzeyleri, 6. Sülfonilüre grubu ilaçlardır.

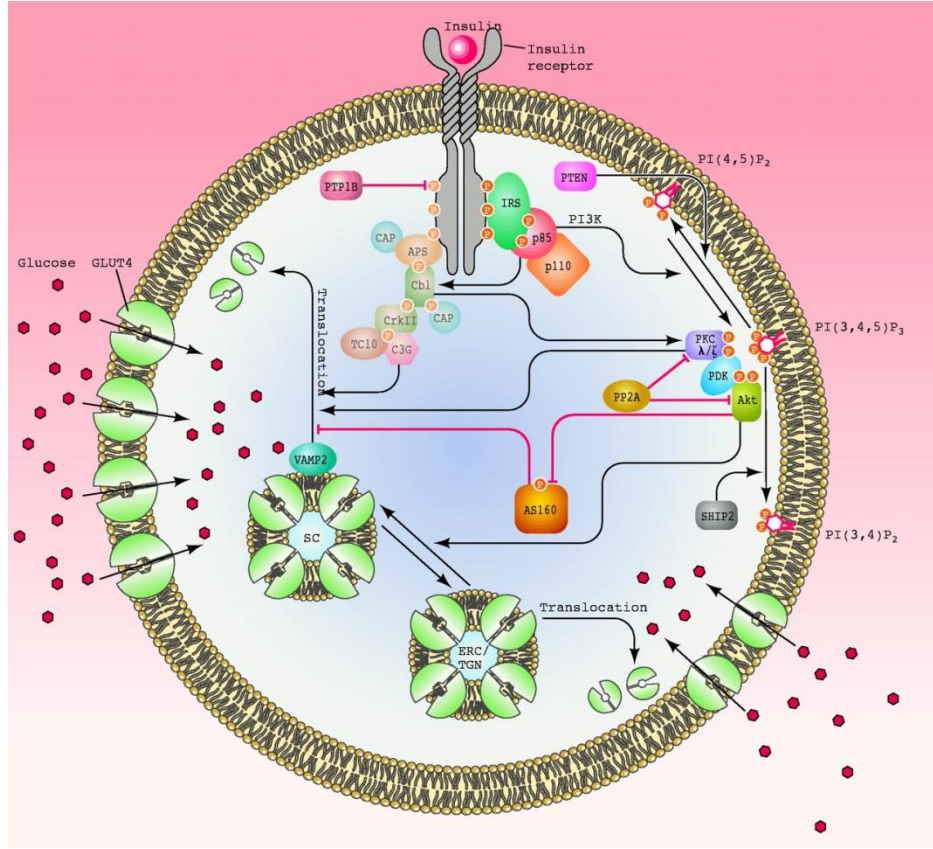
İnsülin öncelikle hipoglisemik etkisiyle bilinen bir hormondur. Hedef hücreleri kas dokusu, yağ dokusu ve karaciğerdir. Ancak vücudun tüm hücrelerinde insülin reseptörü bulunmaktadır. Yemek sonrası salgılanan insülin, karaciğer ve kas dokusunda glikojenez, yağ dokusunda lipojenez ve tüm dokularda protein sentezini uyarak anabolik yönde etki eder. İnsülin hedef hücrelerindeki etkilerinin başlayabilmesi için önce insülinin 300.000 molekül ağırlıklı bir zar reseptör proteinine bağlanarak onu aktive etmesi gerekir. İnsülin reseptörü birbirine disülfid köprüleriyle bağlanmış 4 alt birimin bir araya gelmesinden

oluşmuştur. Bu alt birimlerden 2 α alt birim bütünüyle hücre zarının dışında yer alırken, 2 β alt birim hücre zarı içinden geçerek hücre sitoplazmasına doğru uzanmaktadır. İnsülin hücre dışındaki α alt birimlerine bağlanır ve β alt birimleri ile kurulu olan köprülerden ötürü hücre içine uzanan β alt birimleri otofosforilasyona uğrar. Bu da lokal tirozin kinazı aktive eder. Aktive olan bu enzim daha sonra insülin-reseptör substratları (IRS) olarak bilinen başka bir grup hücre içi enzimin fosforilasyonuna neden olur. IRS'nin farklı tipleri (IRS-1, IRS-2, IRS-3 gibi) farklı dokularda ifade edilir. IRS hücre içinde enzimlerin ve proteinlerin tirozil kalıntılarından fosforile edilmesini sağlar. Olayın net etkisi, fosforile olan enzimlerden bazıları aktive olurken, diğerleri inaktive olur (17) (Şekil 4).



Şekil 4. İnsülin reseptörünün şematik görünümü (17)

Hormon-reseptör bağlantısı kurulduktan sonra kas ve yağ hücrelerinin sitoplazmasında veziküller içinde bulunan GLUT4 proteinleri hareketlenerek membranlara ulaşır. Vezikül membranı, hücre membranı ile birleştiğinde, glukoza hücre içine taşıyacak olan GLUT4'ler membrana dizilmiş olur (Şekil 5).



Şekil 5. GLUT4 trafiğini düzenlemede insülin tarafından aktive edilen ya da baskılanan anahtar moleküler sinyaller (18)

Diğer dokularda ise insülinin bağımsız olarak çeşitli GLUT'lar kullanılarak glukoz pasif taşıma ile hücre içine taşınır (Tablo 1). Glukozun hücre içinde metabolik değişimleri farklı aşamalarda, enzim düzeyinde insülin ile bağlantılıdır. Bu nedenle insülin eksikliği, her hücrede farklı bir noktada glukoz metabolizmasının bozulmasına neden olur. Kanda insülin düzeyi arttığında kaslarda; 1. Glukoz girişi ve kullanımı artar, 2. glikojen sentezi ve depolanması artar, 3. aminoasit girişi artar ve protein sentezi hızlanır, protein yıkımı yavaşlar, 4. büyümenin uyarılması için GH ile beraber çalışır. Yağ dokusunda; 1. Glukoz girişi artar, 2. Lipoprotein lipaz aktivasyonu ile yağ asidi girişi artar, 3. Glikoliz ile gliserol 3-fostat üretimi artar, 4. Yağ asidi sentezi artar, 5. Gliserol 3-fostat ve yağ asitleri kullanılarak trigliserid sentezi ve yağ depolanması sağlanır. Karaciğerde; 1. Glikojenolizi inhibe eder, glikokinaz enzim aktivitesi artar, glukoz hücre içinde glukoz-6-fostat'a dönüşür. Hücre içi glukoz konsantrasyonu azalır ve karaciğere glukoz girişi artar, 2. Glikoliz, glikojen sentezini ve depolanmasını arttırır, 3. Yağ asidi, triaçilgliserol ve kolesterol sentezi artar ve VLDL olarak sekrete edilir, 4. Glikoneojenezi ve protein

katabolizmasını inhibe eder, 5. Keton cisimlerin oluşumu azalır. Tüm bu etkiler kanda glukoz düzeyini düşürmeye yöneliktir.

Açlık Durumunda Kan Glukozunun Düzenlenmesi: İnsülin Karşıtı Sistem

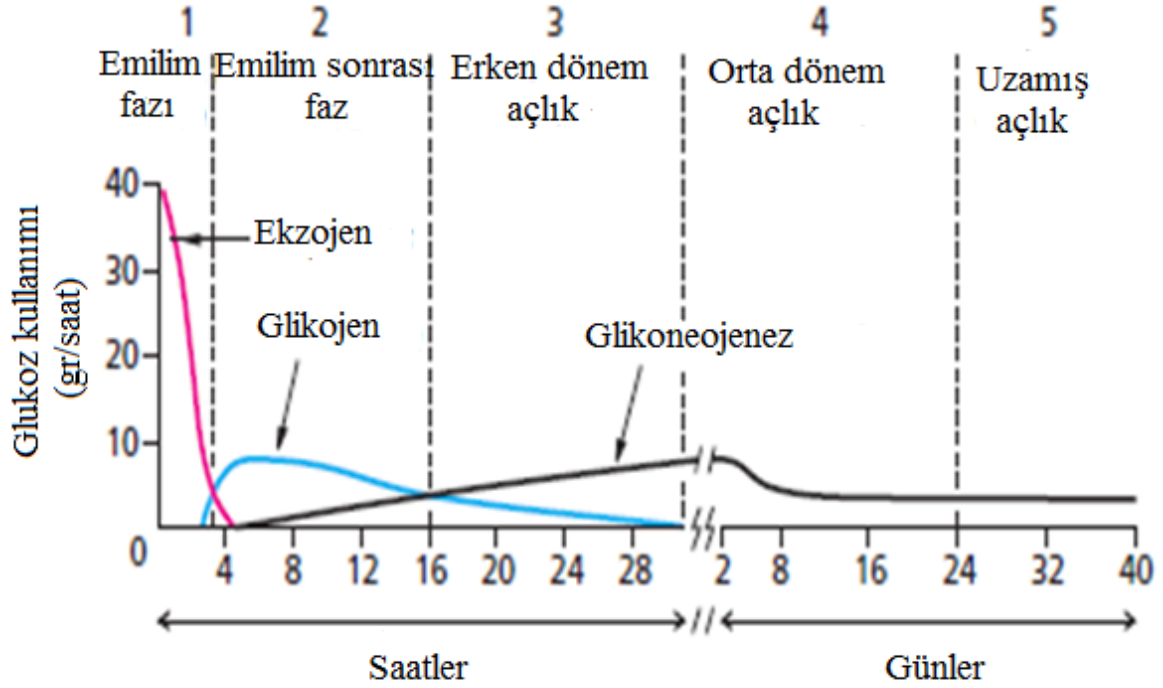
İnsülin karşıtı sistem pankreasın diğeri hormonu glukagon, böbreküstü bezinin medulla hormonu norepinefrin, böbreküstü bezinin korteks hormonu glukokortikoidler ve hipofiz bezi ön lob hormonu olan GH'ü kapsar. İnsülin karşıtı sistem kan glukoz düzeyinin düştüğü açlık durumunda ve glukoz ihtiyacının arttığı stres durumlarında etkilidir. Kan glukoz düzeyinin azalmasını önler. Bu etkisini glikojenoliz ve/veya glikoneojenezini aktifleyerek ve glukoz kullanımını baskılayarak yapar. Karaciğerde glikojen halinde depolanmış olan glukoz, glikojenoliz adı verilen kimyasal bir süreç sonucunda serbest glukozla dönüşür ve kana verilir. Organizmada karbonhidrat depoları normalin altına indiği zaman karbonhidrat olmayan moleküllerden glukoz sentez edilmesi glukoneojenez olarak adlandırılır. Glikoneojenetik substratlar laktat, pirüvat, gliserol ve bazı aminoasitlerdir. Glikoneojenez karaciğeri ve böbreğe ait bir reaksiyon dizisidir. Açlık sırasında kan glukoz konsantrasyonundaki aşırı düşüşü önlemede özellikle önemlidir. Glukoz beyin ve eritrositler gibi dokularda enerji için temel maddedir ve öğünler arası saatlerde de kanda uygun miktarda bulunması gerekmektedir. Bu dönemde glikoneojenez üretimi %90 karaciğeri, %10 böbreklerden sağlanır. Beyne devamlı glukoz sağlanmasına yardımcı olmak için erken dönem açlıkta karaciğeri glukoz üretiminin yaklaşık %25'i glikoneojenez ile gerçekleşir. Uzamış açlıkta kan glukozunun desteklenmesinde glikoneojenez ağırlık kazanır ve böbreğin katkısı artar (15). İnsüline zıt etkili önde gelen hormon glukagondur. Kısa dönem açlıkta glukagon ve epinefrin hormonları beraber çalışır.

Glukagon glikojenolitik, glikoneojenik, lipolitik ve ketojenik bir hormondur. Pankreasın *Langerhans* adacıklarının α hücrelerinde sentezlenen 29 aminoasitli peptit yapılı hormondur. Plazmada taşıyıcı proteini bulunmaz. Portal dolaşım ile karaciğere gelir (15). Glukagona hiperglisemik hormon adı da verilebilir. Başlıca fonksiyonu insülin ile birlikte yakıt homeostazını devam ettirmektir. Glukagon sekresyonunu arttıran faktörler arasında, kanda düşük glukoz (en güçlü faktördür) ve yüksek amino asit düzeyleri, egzersiz ve stres, pankreasın katekolaminler ile sempatik uyarılması sayılabilir. Glukagonun hedef organları karaciğeri ve yağ dokusudur. Kas dokusunda reseptörü yoktur. Karaciğeri ve yağ dokusunda hücre membran reseptörlerine bağlanarak adenilat siklazı uyarır. Artan cAMP, inaktif protein kinazı aktifler ve karaciğerde hedef proteinlerin fosforilasyonu glikojen

sentezini inhibe ederken glikojenolizi arttırır. Glukagonun etkileri; glikojen yıkımının (glikojenoliz), glikoneojenezin, yağ asidi β oksidasyonunun ve karaciğerde keton sentezinin attırılmasıdır. Tüm bu etkiler kanda glukoz düzeylerinin arttırılmasına katkıda bulunur. Glukagon salgısıyla plazmada glukoz ve ketonların yükselmesi, sindirim faaliyetlerinde absorpsiyon sonrası dönemlerde ve uzun süreli açlıklarda önemlidir. Glukagon etkisiyle ketonların artışı, hücrelerde enerji desteği olarak gereklidir. Hipoglisemiye karşı önemli bir savunma sistemi oluşur. Böbrek üstü medulla hormonu olan epinefrin hormonu da gerek kasta gerekse karaciğerde glikojenolizi ve glikoneojenezi arttırır. Ayrıca yağ dokusunda lipolizi artırır. Kas ve yağ dokusunda GLUT4 aracılı glukoz girişini inhibe eder. İnsülin sekresyonunu baskılar ve kas dokusunda proteolizi uyarır.

Uzun dönem açlıkta kortizol ve GH'da devreye girer. Böbrek üstü bezinin korteks hormonu olan kortizol özellikle glikoneojenezi arttırarak etkili olur. Karaciğer hariç tüm dokularda protein yıkımını arttırır. Karaciğerde glikoneojenezle ilgili enzimlerin sentezini indükler, karaciğerden kana glukoz sekresyonunu arttırır, beyin ve eritrosit dışındaki dokularda glukoz kullanımını azaltır. Yağ dokusunda lipolizi hızlandırır. İnsüline zıt yönde etkiler ortaya çıkar. GH da tüm vücut hücrelerinde mitotik aktiviteyi arttıran, protein sentezini hızlandıran, yağların enerji maddesi olarak kullanımını sağlayan, glukoz tüketimini azaltan hormondur (19). Her iki hormonda vücuttaki hücrelerin büyük çoğunluğunun glukoz tüketim hızını yavaşlatır ve bunları daha çok yağ kullanmaya yönlendirir. Bu olayda kan glukoz konsantrasyonunun normale dönmesine yardımcı olur (17) (Şekil 6).

Kan glukoz düzeyinde fizyolojik sapmalar, beslenme, stres, egzersiz, bazal metabolizma değişiklikleri gibi nedenlerle gelişebilir.



Şekil 6. Glukoz kullanım evreleri (20)

Kan glukoz düzeyinde patolojik sapmalar, hiperglisemi ve hipoglisemi şeklindedir. Hiperglisemi, 8-12 saatlik açlıktan sonra serum glukoz düzeyinin 110 mg/dL'den yüksek olması durumu olarak tanımlanır. Hiperglisemi; bazı hormonal bozukluklar, diabetes mellitus, akut miyokard enfarktüsü, santral sinir sisteminde travma, tümör ve ansefalitler, operasyon, karaciğer hastalıkları, intravasküler glukoz veya intramusküler ACTH uygulamaları gibi çeşitli patolojik durumlarda ortaya çıkabilir. Hipoglisemi, serum glukoz düzeyinin 40 mg/dL'den düşük olması durumu olarak tanımlanır. Hipoglisemi, santral sinir sistemini etkilediğinden tehlikelidir. Hipoglisemide temel neden, kana glukoz sağlanmasının azalması veya kan glukozunun kullanımının artmasıdır. 12 saatlik açlıktan sonra saptanan hipoglisemi açlık hipoglisemisi olarak tanımlanır. Beslenmeden sonraki 2-6 saatlik zaman diliminde saptanan hipoglisemi ise postprandial hipoglisemi olarak ifade edilir. Ayrıca çocukluk dönemi hipoglisemileri de saptanmıştır.

DİYABETİN TANIMI

Diabetes Mellitus (DM), pankreasın β -hücrelerinden salgılanan insülin sekresyonunda ya da insülinin etkisinde veya her ikisindeki defektler sonucu karbonhidrat,

yağ ve protein metabolizmasında bozukluklar ile karakterize olan heterojen bir grup metabolizma bozukluğunu kapsar. Başta karbonhidrat metabolizması olmakla beraber protein ve yağ metabolizmasında da birtakım kusurlar olmakta, ağır komplikasyonlarla seyredebilmektedir. DM tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur (21-24). Hastalığın ortak sonucu olan hiperglisemi kontrol altına alınamazsa zaman içinde diyabetin kronik komplikasyonları olarak kabul edilen retinopati, nefropati, periferik ve otonom nöropati gibi mikrovasküler düzeydeki problemlerden kaynaklanan sorunlara yol açar. Diyabetin varlığı, ayrıca diyabete özgü olmayan koroner kalp hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar ve periferik damar hastalıkları gibi makrovasküler sorunların daha erken yaşlarda ortaya çıkmasına ve daha agresif seyretmesine de neden olabilir. Böylece diyabet, hastaların yaşam kalitesini düşürdüğü gibi yaşam süresini de kısaltabilir.

Sınıflandırma

Amerikan Diyabet Birliği (ADA) 2004 yılında diyabetin tanı ve sınıflandırmasını güncellemiştir (25).

1. Tip 1 DM (β hücre harabiyeti, genelde mutlak insülin eksikliği vardır),
 - a) Otoimmün
 - b) İdiyopatik
2. Tip 2 DM (İnsülin direnci ve rölatif insülin eksikliği ile birlikte olan diabet),
3. Diğer spesifik tipler:
 - a) β hücre fonksiyonlarında genetik defekt: Kromozom 12, HNF-1 α (MODY 3), kromozom 7, glukokinaz (MODY 2), kromozom 20, HNF-4 α (MODY 1), mitokondriyal DNA,
 - b) İnsülin eksikliğinde genetik defekt: Tip A insülin direnci, Leprechaunism, Rabson-Mendenhal sendromu, Lipoatrofik diabet,
 - c) Ekzokrin pankreas hastalıkları: Pankreatitis, travma, Pankreatektomi, Neoplazi, kistik Fibroz, Hemokramatozis, Fibrokalküloz pankreatopati,
 - d) Endokrinopatiler: Akromegali, Cushing sendromu, Glukagonoma, Feokromositoma, Hipertiroidizm, Somatostatinoma, Aldosteronoma,
 - e) İlaç veya kimyasal maddeler: Vacor, Pentamidine, Nikotinic asid, Glukokortikoidler, tiroid hormonları, Diazoksid, β adrenerjik agonistler, Tiazidler, Fenitoin, α İnterferon,
 - f) İnfeksiyonlar: Konjenital rubella, Sitomegalovirüs,

- g) İmmün aracılı diyabetin yaygın olmayan formu: Stiffman sendromu, anti insülin reseptör antikoru,
- h) Diyabetle birlikte olabilen diğer genetik sendromlar: Down sendromu, Klinifelter sendromu, Turner sendromu, Wolfram sendromu, Friedreich sendromu, Huntington koreası, Laurence-Moon-Biedl sendromu, Miyotonik distrofi, Porfiria, Prader Willi sendromu,

4. Gestasyonel diyabetes mellitus: Gebelikte ilk kez ortaya çıkan ya da gebelikte fark edilen, her derecedeki glukoz tolerans bozukluğu olarak tanımlanır.

Diyabetin Önemi

Günümüzde, DM ve onunla aynı risk faktörlerine sahip bulaşıcı olmayan, kronik hastalıklar önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Her yıl dünyada 8 ile 14 milyon insan diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve kronik solunum yolu hastalıkları gibi diğer kronik karmaşık hastalıklar nedeniyle kaybedilmektedir. Yaşam tarzındaki hızlı değişim ile birlikte gelişmiş ve gelişmekte olan toplumların tümünde özellikle T2DM prevalansı hızla yükselmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde, özellikle de bu ülkelerden gelişmiş ülkelere göç eden topluluklarda diyabet epidemisinde bahsedilmektedir (5). Tablo 2’de gösterildiği gibi 2009 sonu itibarı ile tüm dünyadaki diyabet nüfusu 285 milyon iken bu sayının 2030 yılında 438 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (6).

Bunun başlıca nedenleri nüfus artışı, yaşlanma ve kentleşmenin getirdiği yaşam tarzı değişimi sonucu obezite ve fiziksel aktivitenin azalmasıdır (26). Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması’nın (TURDEP) (26) sonuçlarına göre ülkemizde T2DM’lu hasta sayısının %13,7’ye ulaştığı görülmüştür. Türkiye’de diyabetin artış hızı dünya ve Avrupa genelinin üzerindedir (Tablo 3) (6,27). Bu durum bozulmuş glukoz toleransı (BGT) için geçerlidir. Bunun başlıca nedeni Türkiye genelinde yaşlı nüfusun artmaya başlamış olması, başta beslenme ve fiziksel aktivite olmak üzere yaşam tarzında meydana gelen değişikliklerdir.

Tablo 2. 2010 yılında dünyada diyabet ve bozulmuş glukoz toleransı ve 2030 yılı için beklenen artış (20-79 yaş grubu) (6,27)

	2010 yılı	2030 yılı
NÜFUS		
Dünya nüfusu (toplam-milyar)	7.0	8.4
Erişkin nüfus (20-79 yaş)	4.3	5.6
Diyabet		
Genel prevalans (%)	6.6	7.8
Dünya nüfusunun standart dağılımına göre prevalans (%)	6.4	7.7
Diyabetli sayısı (milyon)	285	438*
Bozulmuş Glukoz Toleransı (BGT)		
Genel prevalans (%)	7.9	8.4
Dünya nüfusunun standart dağılımına göre prevalans (%)	7.8	8.4
BGT'li sayısı	344	472
Tip 1 Diyabet (0-14 yaş)		
Toplam çocuk nüfusu (milyar)	1.9	-
Tip 1 diyabetli çocuk sayısı (bin)	479.6	-
Yeni tanı tip 1 diyabetli çocuk sayısı (bin)	75.8	-
Yıllık insidans artışı (%)	3.0	-
Diyabetli Mortalitesi (20-79 yaş)		
Diyabete bağlı ölüm sayısı (Erkek)	1.826.485	-
Diyabete bağlı ölüm sayısı (Kadın)	2.136.571	-
Diyabete Bağlı Sağlık Harcamaları		
Kişi başı sağlık harcamaları R-2**	703 ABD	-
	doları	

*2010'dan 2030'a diyabet artışı %54,0 **R=2: Düşük gelir grubu ülkelere göre diyabet maliyet oranı.

Tablo 2. Dünya Sağlık Örgütü Diyabet Projeksiyonu 2000–2030 (28)

	2000	2030	Artış oranı (%)
Dünya	171.000.000	366.000.000	114
Avrupa	33.332.000	47.973.000	144
Türkiye	2.920.000	6.422.000	220

OBEZİTENİN TANIMI

Obezite, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından "Sağlığı bozacak ölçüde vücutta anormal veya aşırı yağ birikmesi" olarak tanımlamaktadır (28,29). Yetişkin erkeklerde vücut ağırlığının ortalama %15-20'sini, kadınlarda ise %25-30'unu yağ dokusu oluşturmaktadır (30,31). Erkeklerde bu oranın %25, kadınlarda ise %30'un üzerine çıkması durumunda obezite söz konusudur (27,32,33). Obeziteyi belirlemek için DSÖ'nün obezite sınıflandırması kullanılmakta ve genellikle Beden Kitle İndeksi (BKİ) esas alınmaktadır (28). BKİ, bireyin vücut ağırlığının (kg), boy uzunluğunun (m) karesine ($BKİ=kg/m^2$) bölünmesiyle elde edilen bir değerdir (2). BKİ boy uzunluğuna göre vücut ağırlığını değerlendiren bir gösterge olup, vücutta yağ dağılımı hakkında bilgi vermemektedir (33). BKİ'ye göre yetişkinlerde zayıflık, fazla kiloluluk ve obezite sınıflandırması Tablo 4'de verilmiştir.

Obezitenin Önemi

Obezite küresel boyutta önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada hem gelişmiş ülkelerde hem de gelişmekte olan ülkelerde obezite her geçen gün artış göstermektedir. DSÖ tarafından Asya, Afrika ve Avrupa'nın 6 ayrı bölgesinde yapılan ve 12 yıl süren MONICA çalışmasında obezite prevalansında 10 yılda %10-30 arasında bir artış saptandığı bildirilmiştir (28). Obezitenin en sık görüldüğü ABD'de Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi (CDC) tarafından yürütülen NHANES (ABD-Ulusal Beslenme ve Sağlık Araştırması) çalışmasına göre, 2003-2004 yıllarında obezite prevalansının erkeklerde %31,1; kadınlarda %33,2; 2005-2006 yıllarında ise erkeklerde %33,3, kadınlarda ise %35,3 olarak tespit edildiği açıklanmıştır (30). Avrupa'da yetişkinler üzerinde yürütülen çeşitli çalışmalara göre fazla kilolu olma prevalansı erkeklerde %32-79, kadınlarda ise %28-78 arasında; obezite prevalansı ise erkeklerde %5-23, kadınlarda %7-36 arasında değişmektedir. Bu çalışmalara göre fazla kilolu olma durumunun en yüksek olduğu ülkeler

Arnavutluk, Bosna-Hersek ve İngiltere (İskoçya)'dır. Türkmenistan ve Özbekistan ise prevalansın en düşük olduğu ülkelerdir (1). DSÖ verilerine göre fazla kiloluluk ve obezite, Avrupa'daki yetişkinlerde T2DM vakalarının %80'inden, iskemik kalp hastalıklarının %35'inden ve hipertansiyonun %55'inden sorumludur ve her yıl 1 milyondan fazla ölüme neden olmaktadır. Hiçbir önlem alınmadığı takdirde, obezite prevalansındaki artışın da 1990'lardaki hızıyla devam ettiği düşünüldüğünde, Avrupa'da 2012 yılına kadar 150 milyon yetişkin, 15 milyon çocuk ve adolesanın obez olacağı tahmin edilmektedir (34).

Tablo 3. Yetişkinlerde Beden Kitle İndeksine göre zayıflık, fazla kiloluluk ve obezite sınıflandırması (27)

Sınıflandırma	BKİ (Kg/m ²)	
	Temel kesişim noktaları*	Geliştirilmiş kesişim noktaları*
Zayıf (düşük ağırlıklı)	<18.50	<18.50
Aşırı düzeyde zayıflık	<16.00	<16.00
Orta düzeyde zayıflık	16.00 – 16.99	16.00 – 16.99
Hafif düzeyde zayıflık	17.00-18.49	17.00 – 18.49
Normal	18.50 – 24.99	18.50 – 22.99
Toplu, hafif şişman	≥25.00	≥25.00
	25.00 – 29.99	25.00 – 27.49
Şişmanlık öncesi (Pre- obez)		27.50 – 29.99
Şişman (Obez)	≥30.00	≥30.00
		30.00 – 32.49
Şişman I. Derece	30.00 – 34.99	32.50 – 34.49
		35.00 – 37.49
Şişman II. Derece	35.00 – 39.99	37.50 – 39.99
Şişman III. Derece	≥40.00	≥40.00

Kesişim değerleri, BKİ ve Avrupalı toplumlardaki mortalite ve hastalık risk etmenlerinin ilişkisine dayanmaktadır.

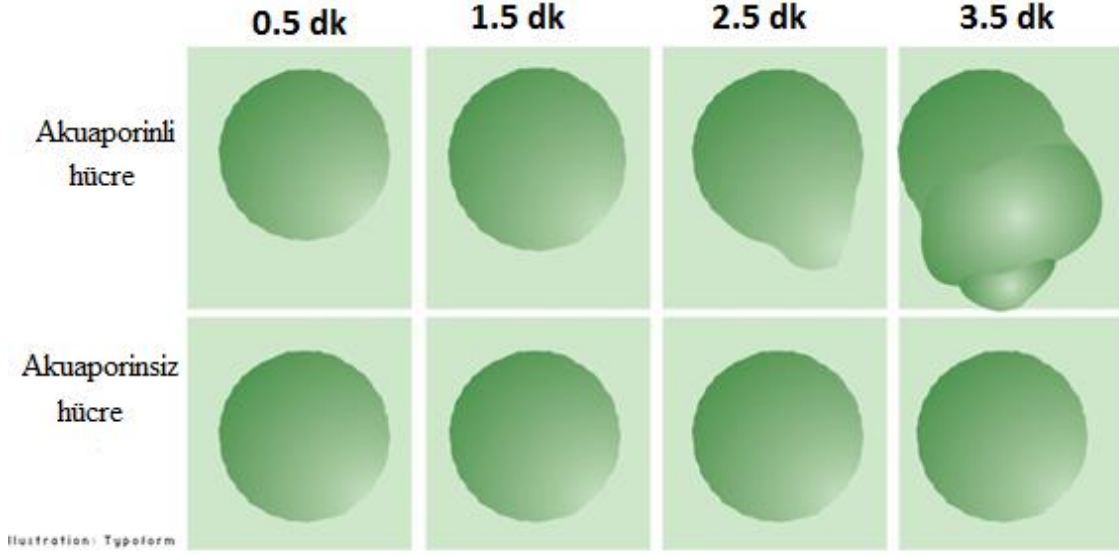
Ülkemiz, beslenme durumu yönünden hem gelişmekte olan, hem de gelişmiş ülkelerin sorunlarını birlikte içeren bir görünüme sahiptir. Türkiye'de halkın beslenme durumu bölgelere, mevsimlere, sosyoekonomik düzeye ve kentsel-kırsal yerleşim yerlerine göre önemli farklılıklar göstermektedir. Gelir dağılımındaki dengesizlik beslenme sorunlarının niteliği ve görülme sıklığı üzerinde etkili olmaktadır. Ayrıca beslenme konusundaki bilgisizlik, hatalı besin seçimine, yanlış hazırlama, pişirme ve saklama

yöntemlerinin uygulanmasına neden olmakta ve beslenme sorunlarının boyutlarının büyümesine yol açmaktadır (35). Türk Kardiyoloji Derneği (TKD) tarafından yapılan ve 3681 kişiyi kapsayan TEKHARF çalışmasında BKİ 30 kg/m² obezite olarak tanımlanmış ve 30 yaşını aşkın Türk erkeklerinin dörtte birinde (%25,2), kadınların da yarıya yakınında (%44,2) obezite tespit edilmiştir. Orta yaşlı (31-49 yaş) ve yaşlı (50 yaş ve üzeri) gruplarda ayrı ayrı ele alındığında, bu prevalansın erkeklerde anlamlı biçimde değişmediği (%24,8 ve 25,7), kadınlarda ise önemli ölçüde arttığı (sırasıyla %38 ve %50,2) bildirilmiştir. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü tarafından 7 coğrafik bölgeden seçilen 7 ilde 14 sağlık ocağında yapılan "Sağlıklı Beslenelim, Kalbimizi Koruyalım (SBKK)" çalışmasına göre, erkeklerde obezite sıklığı %21,2 iken; kadınlarda %41,5 olarak bulunmuştur. BKİ değeri 40-69 yaş arasında doğrusal olarak artmakta ve 70 yaşından sonra düşmektedir (31).

AKUAPORİNLER

Hücreler kendilerini çevreleyen biyolojik zarlar tarafından dış ortamdaki ayrılır. Zar genetik materyali, yapısal proteinleri, metabolitleri ve yaşam için gerekli molekülleri koruyarak hücrenin yapısal bütünlüğünü sağlar. Zara yerleşik proteinler ise hücreyle dış ortam arasındaki madde değişimini kontrol eder. Oksijenli solunumun son ürünü ve hemen hemen tüm metabolik olaylarda rol oynayan suyun membran boyunca hareketi uzun yıllardır araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Hücre hacminin ve gerekli iç ozmolaritenin düzenlenmesi birçok durumda suyun ve tuzların hücre zarından geçişinin kontrol edilmesine bağlıdır (7,36). 1920'lerde çift katmanlı lipid tabakanın tanımlanmasıyla hücrelerin iç ortamlarındaki özgün koşulları dış ortamdaki koşullara rağmen nasıl muhafaza edebildikleri anlaşıldı. 1950'lerin başlarında taşıyıcı kanalların keşfiyle moleküllerin transmembran hareketlerinin moleküler temelleri gösterildi. Ancak lipid zardan suyun difüzyonu üzerine tartışmalar uzun süre devam etti. 1960'lı yıllarda, amfibi deri epiteli ve eritrositler gibi su geçirgenliği yüksek olan hücrelerde suyun lipid zardan difüzyon dışında başka bir yolla da geçmesi gerektiği öne sürüldü. Taşıyıcı birçok kanal proteini su kanalı özelliği göstermediği için eritrositlerde ve *Xenopus* oositlerinde bulunan "Glukoz taşıyıcısı 1" (*Glucophorin1*), su taşıyıcı kanal adayı olarak ortaya atıldı (37). 1991 yılında Smith ve ark. (38) ilk olarak eritrosit membranında RH (D) antijeni ile birlikte orijinal ismi "Channel-forming Integral Protein" (CHIP28) olan 28 kDA ağırlığındaki su kanal proteinini tanımladılar. 1992 yılında Preston ve ark. (Preston GM, 1992), *Xenopus* oositleri

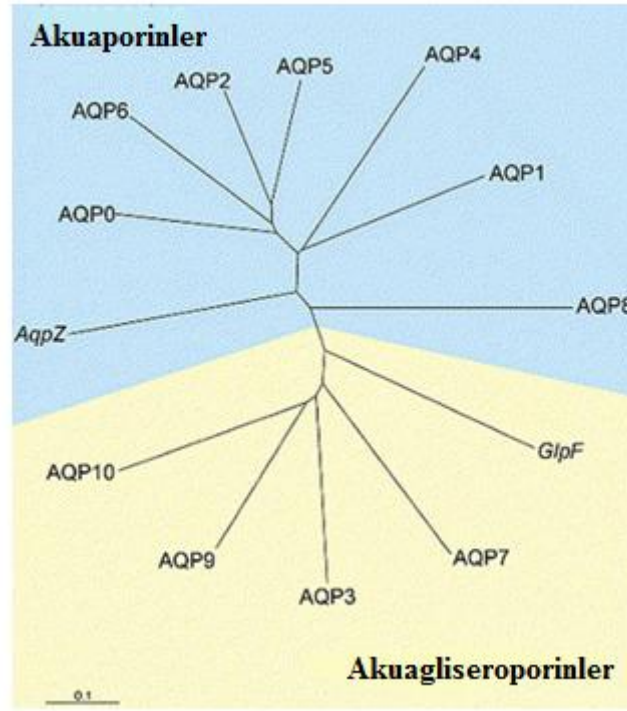
üzerinde CHIP28'i su kanal molekülü olarak gösterdiler (39). *Xenopus laevis* oositlerinde yapılan deneyler sonucunda her bir kanalın çok yüksek su geçirgenliğine sahip olduğu gösterildi (Şekil 7).



Şekil 7. Akuaporin ifade eden ve ifade etmeyen hücrelerle Peter Agre tarafından yapılan deney. Akuaporinler hücrenin su emilimi ile şişmesi için gereklidir (39).

1993 yılında Fushimi ve ark. (40), renal toplayıcı kanalda su kanalının bir başka formunu tanımladılar. Aynı yıl Agre ve arkadaşları (41), su kanal proteinlerine akuaporin (AQP) adını verdiler ve CHIP28'in adı AQP1 olarak değiştirildi. Bu çalışmalarını ile membranlardan su geçişinin moleküler temelini aydınlatması nedeniyle Peter Agre 2003 yılında Nobel Kimya ödülünü kazanmıştır. Su molekülleri AQP1 kanalından çok hızlı geçerler. Yaklaşık olarak bir saniyede 10^9 su molekülü kanaldan geçmektedir. Bitkilerde, mikroskobik canlılarda, omurgalılarda ve omurgasızlarda 200'den fazla akuaporin tanımlanmış olmasına rağmen pek çoğunun işlevi hala tam olarak anlaşılamamıştır (7). Akuaporinlerin geçirgenliği ozmotik gradient tarafından kontrol edilen nötral porlar aracılı difüzyon ile gerçekleşir (39). Çalışmalar kanalın yapısı, fonksiyon mekanizması, filogenetik ağacı yönünde ilerledikçe akuaporin tipleri arasında farklılık olduğu gözlemlendi. Geniş bir aile olan akuaporinler temel olarak membranlardan su geçişini sağlar. Ancak bazı üyeler sadece su geçişini değil, aynı zamanda non-iyonik, küçük nötral moleküllerin de membranlardan geçişini sağlarlar. Hatta bazı izoformları nitrat, klor ve amonyak gibi

iyonların da geçişine izin vermektedir. Memelilerin tüm hücre tiplerinde bulunan akuaporinlerin günümüzde 13 üyesi (AQP0-12) tanımlanmıştır (Tablo 5). Akuaporin ailesinden 0, 1, 2, 4, 5, 6 ve 8 sadece su kanalı olarak işlev görürler. Her ne kadar aminoasit dizilimi olarak diğerlerine benzese de AQP6 anyon, AQP8 ise üre kanalı olarak da iş görmektedir. AQP 3, 7, 9, 10 ise gliserolün de geçişini sağladıkları için **akuagliseroprin** olarak adlandırılırlar. Son zamanlarda tanımlanan AQP11 ve AQP12 ise **süperakuaporin** olarak adlandırılırlar (7) (Şekil 8).



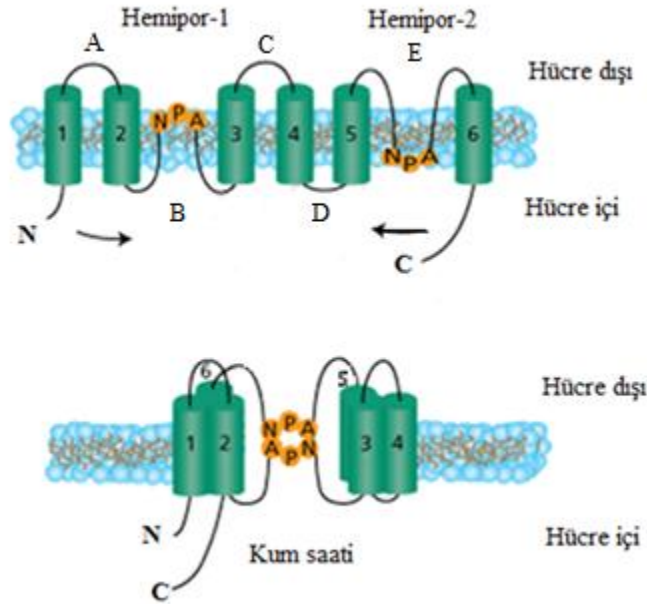
Şekil 8. İnsan akuaporin gen ailesi (7)

Tablo 4. Akuaporinleri kodlayan kromozom bölgeleri, su ve gliserol geçirgenlikleri ile buldukları dokular (42)

Akuaporin	Kromozom	Su geçirgenliği	Gliserol geçirgenliği	Bulduğu doku
AQP0	12q13	Düşük	-	Lens
AQP1	7p14	Yüksek	-	Eritrosit, akciğer, böbrek, beyin, göz ve vasküler endotel
AQP2	12q13	Yüksek	-	Böbrek
AQP3	9p13	Yüksek	Evet	Cilt, böbrek, akciğer, göz, Gastrointestinal sistem, kaslar
AQP4	18q22	Yüksek	-	Böbrek, beyin, akciğer, göz, Gastrointestinal sistem, kaslar
AQP5	12q13	Yüksek	-	Tükrük, gözyaşı, tat bezleri, akciğer ve göz
AQP6	12q13	Düşük	-	Böbrek
AQP7	9p13	Yüksek	Evet	Yağ dokusu, böbrek, testis
AQP8	16p12	Yüksek	-	Böbrek, karaciğer, lökosit, beyin ve testis
AQP9	15p22	Düşük	Evet	Karaciğer, lökosit, beyin ve testis
AQP10	1q21	Düşük	Evet	Gastrointestinal sistem
AQP11	11q13	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Beyin, karaciğer ve böbrek testis
AQP12	2q37	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor

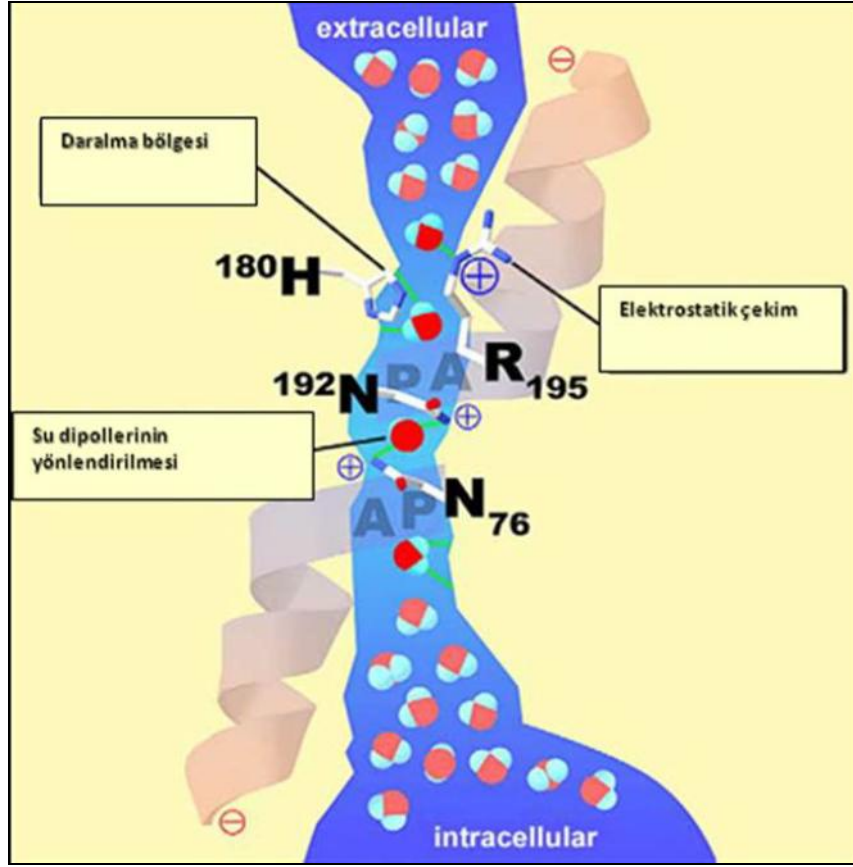
Akuaporinlerin Yapısal Özellikleri ve İşlevi

Suya karşı geçirgen olan hücre zarının kapasitesi birçok hücrenin ihtiyacını karşılamak için yetersizdir. Zarlarda bulunan protein kanallar zarın su geçirgenliğini belirlemektedir. Bu su kanalları aynı zamanda madde geçişine boyut, hidrofobik veya hidrofilik özelliklere göre sınırlamalar getirmektedir. Kanal genişliği yeterince büyük olursa hidrate iyonlar dahi geçebilirken aksi durumda kanalın aminoasit kompozisyonu elektrostatik ilgiyle iyon geçişini düzenlemektedir. 1994 yılının başlarında önerilen Şekil 9'da gösterilen kum saati modeline göre su kanalları asparajin-prolin-alanin (NPA) bölgeleri içmekte ve zarı 6 kez geçmektedir. Kanal proteininin hem *amino* hem *karboks* ucu sitozolik yüzedir ve A, C ve E bölgelerinin dış yüzde, B ve D bölgelerinin ise sitoplazmik yüzeyde dönüş yaptığı görülmüştür (43, 44). NPA bölgelerindeki B ve E dönüşleri bitişik konuma getirilerek kum saatinin merkezinde sınırlandırılmış bir alan oluşturulmakta ve NPA tekrar bölgesinin yanındaki su akışı tek sıra halinde gerçekleşmektedir.



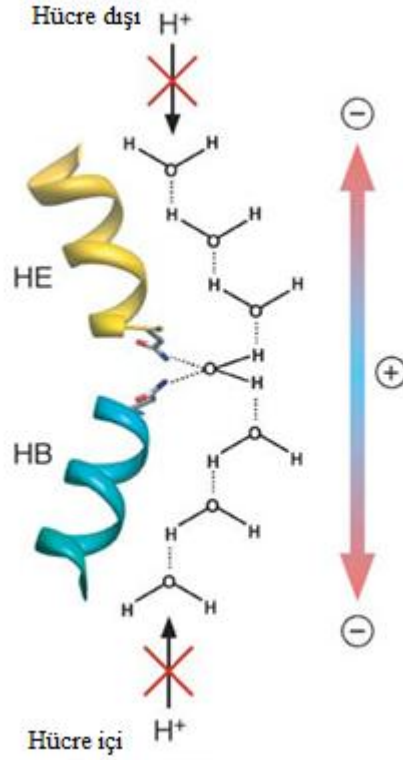
Şekil 9. Akuaporin kanal yapısı. 2 ayrı tekrardan oluşan 6 transmembran heliksi (7)

Kanal altında, su gibi küçük moleküllerin geçişine izin veren, özellikli bir boğaz bölgesi mevcuttur. Boğazı meydana getiren yan zincirler fenilalanin, histidin, sistein ve argininden meydana gelmektedir (45) (Şekil 10).



Şekil 10. Akuaporin1 kanalından su geçişinin fonksiyonel şeması (46)

Akuaporinler protonların geçişine izin vermezler (Şekil 11). Zaten böyle hızlı geçişte bu mümkün olsaydı, membran elektrokimyasal gradienti bozulurdu. Hem suyun hızlı geçişini sağlayan hem de yalnız suyu geçiren bu kanallarda bu olağanüstü selektif geçirgenliğin sebebi, X ray difraksiyon analizleri ile anlaşılmıştır. Akuaporinlerin dört monomere sahip olması ve tek başına su moleküllerinin geçişine izin veren her monomer 2-3 Å çapında transmembran poruna sahip olmasıdır. Su kanallarından su ve diğer solütlerin geçişi konsantrasyon farkına göre yürütülen pasif taşıma mekanizmasının bir tipi olan kolaylaştırılmış difüzyon ile olur (7).



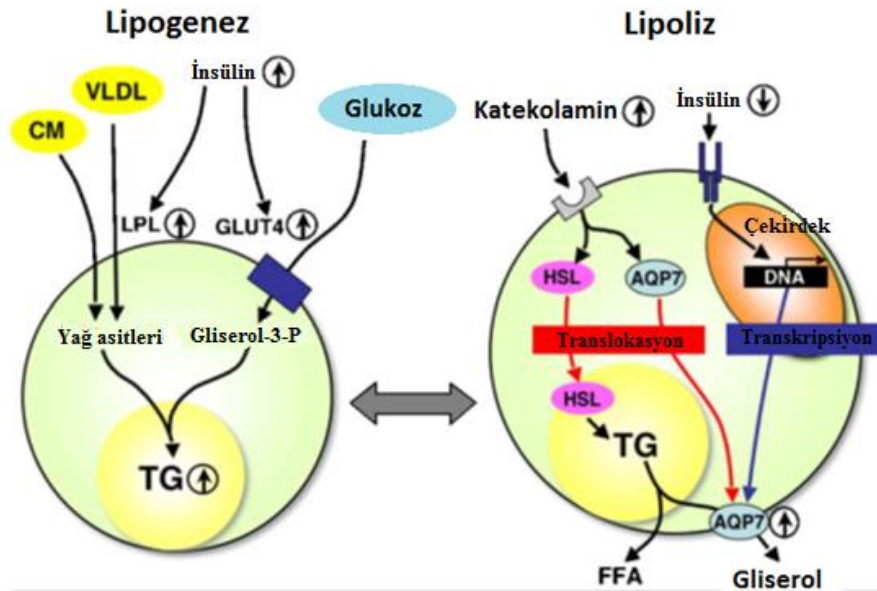
Şekil 11. Proton dışlama mekanizması (39)

Akuaporin 7

Yağ dokusunda AQP7 ifadesinin diğer dokulardan daha fazla olduğu, ayrıca testis, epididim, gastrointestinal kanal, iskelet kası, kalp, böbrek ve iç kulakta da bulunduğu gösterilmiştir (9,46). Yağ dokusunda, gliserol omurgasına ester bağı ile bağlı 3 adet yağ asidinden oluşan trigliseridler memeli organizmasının temel yakıt kaynağı olarak depolanır. Vücudun tüm enerji dengesini düzenlemek için lipogenez ve lipoliz gerçekleşir (47-49). Şekil 12 ve 13’de gösterildiği gibi açlık veya uzun süren egzersizde yağ dokusundaki trigliseridler hidroliz olur. Açığa çıkan serbest yağ asidi (FFA) ve gliserol dolaşıma salınır. Yağ hücresi plazma membranından dolaşıma yağ asitlerinin geçişi basit difüzyon veya bazı proteinler (CD36 gibi) aracılığı ile olurken; gliserolün geçişi ise AQP7 aracılığı ile gerçekleşir (48).



Şekil 12. Adiposit oluşumu ve işlevinde AQP7'nin rolü (50)



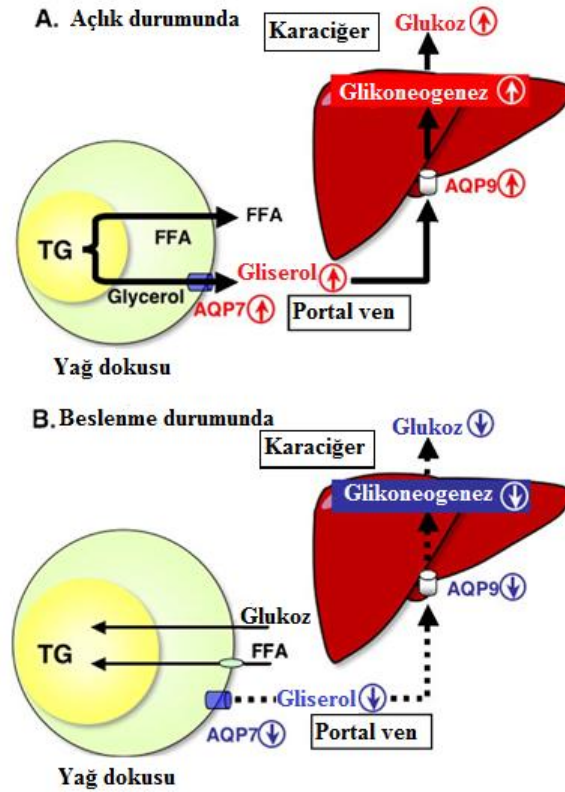
Şekil 13. Yağ dokusunda lipogenez ve lipolizin düzenlenmesi (4)

Dolaşımdaki serbest yağ asitleri karaciğer, iskelet ve kalp kası tarafından alınmakta ve enerji sağlamak üzere kullanılmaktadır. Gliserol ise Şekil 14'de gösterildiği gibi AQP9 aracılığı ile karaciğer dokusuna alınmakta ve glikoneojenetik substrat olarak

kullanılmaktadır. Yağ dokusunda AQP7 ifadesinin insülin ile baskılandığı, epinefrin uyarısı ile arttığı gösterilmiştir.

Akuaporin 9

İnsan AQP9 ifadesinin karaciğer, lökosit, akciğer ve dalakta mevcut olduğu gösterilmiştir. (13,4). Karaciğerdeki AQP9 ifadesi sinüsoidal plazma membranında yer almaktadır (4). Lipoliz esnasındaki yağ dokusunda TG'in hidrolizi ile açığa çıkan gliserol; direkt olarak portal ven ile karaciğere AQP9 ile alınır ve glikoneojenez substratı olarak kullanılır. AQP9 ifadesinin karaciğerdeki tek gliserol kanalı olduğu düşünülmektedir (14). AQP9 mRNA seviyesi açlık durumunda artar ve besin alımı ile azalır (51) .

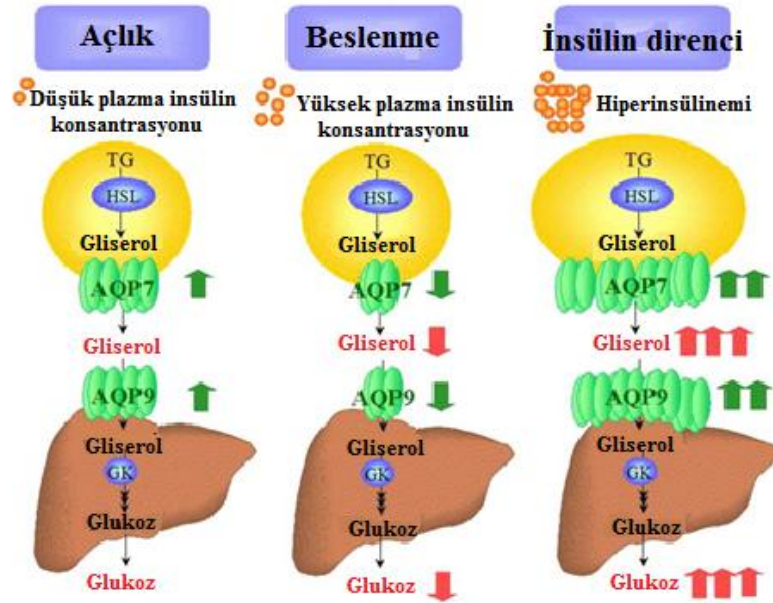


Şekil 14. Yağ dokusunda Akuaporin 7 ve karaciğerde Akuaporin 9'un açlık ve beslenme durumunda düzenlenmesi (52)

Yağ Dokusu ve Karaciğer Gliserol Kanallarının Koordinasyonu

Yağ dokusu, açlık durumunda enerji homeostazının sürekliliği için enerji desteğinde önemli rol oynar ve uzun süren açlık durumlarında bireyin hayatta kalmasına katkıda bulunur. Gliserol serum glukoz konsantrasyonunun belirlenmesinde önemli

faktörlerden biridir (53). Açlık ve yoğun egzersiz durumlarında, hepatik glukoz dolaşımdaki glukoz konsantrasyonu için ana kaynaktır ve plazma gliserol hepatik glikoneojenez için ana substrat olarak kullanılır (54,55). Yağ dokusu plazma gliserolü için en önemli kaynaktır. Yağ dokusuna spesifik gliserol kanalı, AQP7 plazmada yağ kaynaklı gliserolün sağlanması için çıkış kapısı olarak görev alır. Bu plazma gliserol karaciğere spesifik akuagliseroporin, AQP9 ile hepatositlerden içeri alınır. Karaciğere alınan gliserol glukozun yeniden sentezlenmesi için glikokinazın enzimatik etkinliği ile gliserol-3-fosfata dönüştürülür (51). Beslenme sonrası, plazma insülin konsantrasyonu artar ve bu genlerin düzenleyici bölgelerinde negatif IRE aracılığı ile karaciğere spesifik AQP9 ve yağ dokusunda AQP7 ifadeleri baskılanır. İlginç bir şekilde, insülin direnci olan obez *db/db* farelerde hiperinsülinemi olmasına rağmen karaciğer spesifik AQP9 ve yağ dokusunda AQP7 ifadelerinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. Akuaporin 7 ve Akuaporin 9'un glukoz homeostazındaki fonksiyonu (56)

İnsülin direnci olması durumunda bu akuaporinlerin ifadelerinin artması yağ dokusunda IRS-1 aracılı azalmış insülin sinyali ve hepatositlerde IRS-2 ile uyarılmış insülin sinyalinin azalmasına neden olabilir. Fizyolojik koşullar altında, AQP7 ve AQP9'un insüline bağımlı düzenlenmesi birlikte değerlendirildiğinde, beslenme durumuna bağlı olarak glukoz üretimini düzenlemek amacıyla yağ dokusundan gliserolün salınımı ve

karaciğerde glikoneojenezin artması veya azalmasından sorumlu olabilir. Bununla beraber, insülin direncinin olduğu durumda, AQP7 ve AQP9 ifadelerinin çok arttığı görülür. AQP7 ifadesinin artması plazma gliserol konsantrasyonunun artmasına neden olur. Dolaşımdaki gliserol konsantrasyonunun artması AQP9 ifadesinin artmasına ve hepatik glukoz üretimine neden olur. Mevcut bulgular obezitede ve T2DM hastalığında, yağ dokusuna özgü AQP7 ve karaciğere özgü AQP9 ifadelerinin düzenlenmesinde bozulma olabileceğini düşündürmektedir (56).

AQP7 ve AQP9 Gen Polimorfizm Çalışma Yöntemleri

AQP7 ve AQP9 gen polimorfizmlerinin belirlenmesinde, diğer polimorfizmlerin belirlenmesinde olduğu gibi, çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Gen polimorfizmlerinin analiz edilmesinde ilk defa uygulanan ve hala günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu/ Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) yöntemidir. Günümüzde “LightCycler” (LC) gibi gerçek zamanlı PCR (Real time-PCR) cihazları ve floresan boyalarla işaretli hibridizasyon problemlerinin geliştirilmesi ile Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) yöntemi de kullanılmaya başlanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu “polymerase chain reaction” (PCR), herhangi bir organizmaya ait genomik DNA’da dizisi bilinen herhangi bir bölgenin in vitro şartlarda enzimatik olarak çoğaltılmasına “amplifikasyon” olarak veren DNA sentez yöntemidir. PCR, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere uygun oligonükleotid primerlerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. PCR, tekrarlanan 3 basamaktan oluşan bir yöntemdir.

Bu basamaklar:

1. Çoğaltılmak istenen DNA’nın yüksek sıcaklıkta denatüre edilerek tek zincirli hale getirilmesi “denatürasyon” (90-95°C).
2. Özgül hibridizasyonun gerçekleşmesini sağlayacak sıcaklıkta (Tm değerinin 3–5°C altındaki sıcaklık), primerlerin hedef bölgeye bağlanması “annealing” (37-65°C).
3. Taq DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği 72°C’de zincirin primerlerden itibaren uzama “elongasyon” (70-75°C) basamaklarından oluşur.

Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Gerekli Olan Bileşenler

1. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA,
2. Çoğaltılacak DNA molekülündeki hedef dizilere hibridize olabilen, 15–20 nükleotidden oluşan sentetik oligonükleotid primer çifti,
3. Zincirin uzama reaksiyonunu gerçekleştiren DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli olan *Taq* DNA polimeraz enzimine ihtiyaç duyulmaktadır.

PCR, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere uygun iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanmaktadır. Oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere hibridize olurlar. Bu nedenle hedef bölgeye özgül uygun primer çiftinin seçimi çok önemlidir. Primerlerin özgül olarak hedef diziyeye bağlanmaları düşük sıcaklık derecelerde gerçekleşmektedir. Denatürasyonu ardışık primerin bağlanması aşamasındaki T_m /bağlanma sıcaklığı oranının saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir.

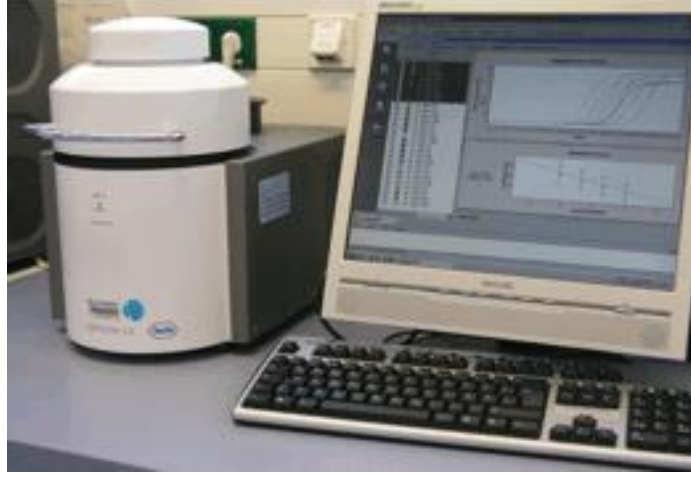
$$T_m = [4^\circ\text{C}(\text{G}+\text{C}) + 2^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T})]$$

Zincirin uzama reaksiyonu, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen, optimal 72°C sıcaklıkta aktivite gösteren ve 94°C 'de hala aktivitesini kaybetmeyen *Taq* DNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. DNA polimeraz enzimi, MgCl_2 ve dört çeşit deoksiribonükleotid trifosfat (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) varlığında primerin 3'hidroksil ucundan uzamasını sağlamaktadır. Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluşturmakta, polimeraz aktivitesini stimüle etmekte ve çift iplikli DNA'nın T_m derecesini arttırmaktadır. Bu nedenle MgCl_2 , PCR'ın özgülüğü ve ürün verimi üzerinde önemli bir etki göstermektedir. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu, azalan ürün oluşumuna, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün artışına neden olmaktadır. Zincirin uzama aşamasının tamamlanmasından sonra tek iplikli DNA, çift iplikli DNA haline gelmektedir. 1. döngü sonunda 2 yeni DNA zinciri oluşmakta ve her döngü sonunda DNA miktarı 2 katına çıkmaktadır. Böylece, 30-45 döngü sonunda hedef DNA'nın milyonlarca kopyası oluşturulmuş olacaktır (57).

Gerçek- Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu “Real Time-PCR”

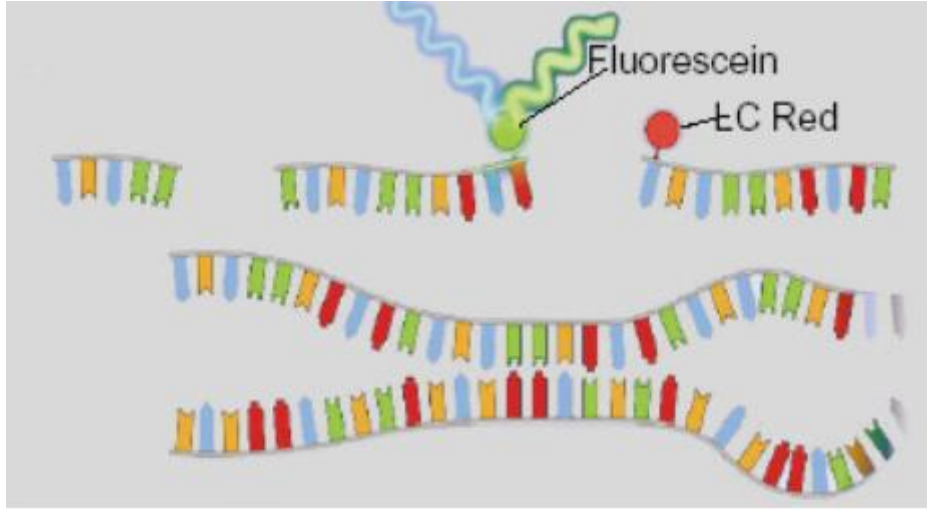
“LightCycler2.0” cihazı (Şekil 16), kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PCR reaksiyonu, moleküler genetikte bir reaksiyonda polimorfik DNA bölgelerinin kantifikasyonunun ve tek nükleotid polimorfizm genotiplendirilmelerinin yapılabildiği bir

tekniktir (58). Bu teknik kullanılarak nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif değerler elde edilebilmektedir. Hızlı ısıtma ve soğutma özelliğine sahip olan “LightCycler2.0” cihazı, 20-30 dakika içinde 30-40 PCR döngü gerçekleştirdiğinden çalışmalarda oldukça avantaj sağlamaktadır (58,59). Gerçek zamanlı-PCR cihazı yüksek hızı yanında, kontaminasyon riskini de minimuma indirmektedir. Ayrıca, amplifikasyon işlemi eş zamanlı olarak bilgisayarda görüntülenebildiği için PCR döngüsü başarısız olduğunda, reaksiyon çok geçmeden sonlandırılabilir veya döngü artışı yapılabilir (58). Elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon ürünlerinin gözlenmesi en büyük kolaylığı sağlamaktadır.



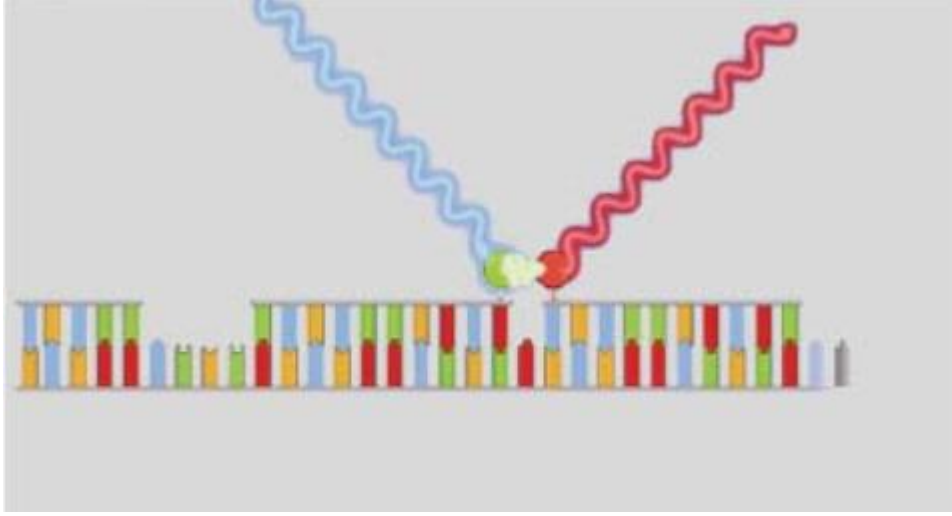
Şekil 16. LightCycler2.0 Cihazı

“LightCycler2.0” cihazı ile genotipleme çalışmalarında özgün primerlerin yanında testin özgüllüğünü arttırmak amacıyla hedefe özgü hibridizasyon problemleri kullanılmaktadır. Bu hibridizasyon problemleri, floresans boyalarla işaretlenen dizilere özgü oligonükleotid problemlerdir. DNA zincirine baş ve kuyruk pozisyonunda hibridize olacak şekilde dizayn edilen bu problemler, DNA zincirindeki polimorfik bölgeyi örten sensör hibridizasyon probu ile bu proba yakın bir bölgeye bağlanan “anchor” problemlerden oluşmaktadır (Şekil 17).



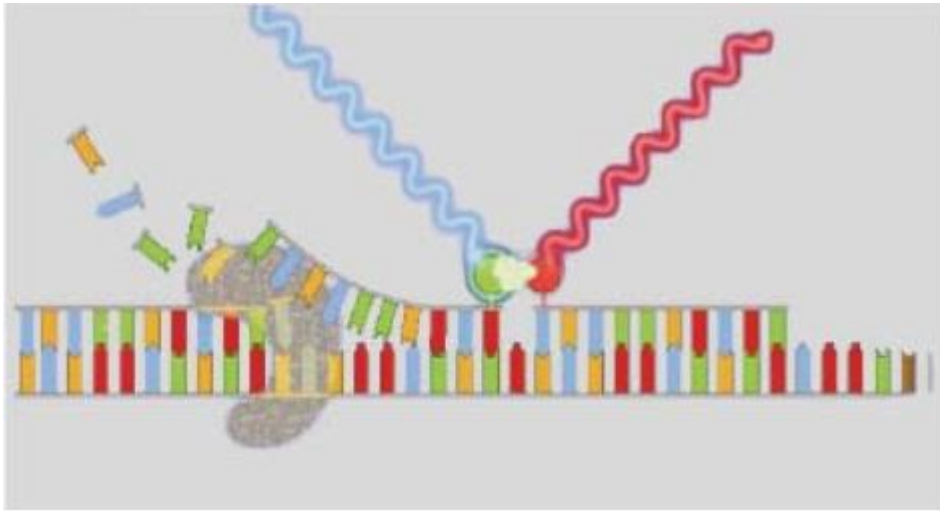
Şekil 17. Bu hibridizasyon problemlerinden sensör prob 3' ucundan "Fluorescein" (donör boya) ile "anchor" prob ise 5' ucundan LC Red 640 (alıcı boya) ile işaretlenmiştir. Denatürasyon basamağında hibridizasyon problemleri solüsyon içerisinde ayrı ayrı durmaktadırlar (59).

Hibridizasyon problemleri amplifikasyon süresi boyunca DNA segmentine bağlıdırlar. Problemler hedef DNA dizisi üzerinde birbirine 1-5 nükleotit uzaklıktaki mesafede bağlanmakta ve floresan boya ile işaretlenmiş olan uçlar yan yana gelmektedir. LC cihazının ışık kaynağından "Light Emitting Diode" yayılan 470 nm'deki mavi ışık, "fluorescein" ile işaretlenmiş olan sensör probunu uyararak daha uzun dalga boyundaki (530 nm) yeşil floresans ışığın yayılmasına neden olmaktadır. İki floresan boya ile işaretlenmiş olan problemlerin yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmakta ve yeşil ışığın enerjisi LC Red 640 boyası içinde farklı bir dalga boyundaki (640 nm) kırmızı floresan ışığın yayılmasına neden olmaktadır. İki prob arasında meydana gelen bu enerji transferi, "Fluorescence Resonance Energy Transfer" olarak adlandırılmaktadır (59). Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğer bir ifadeyle PCR siklus süresince oluşan ampliconların miktarına bağlı olarak artmaktadır. LC cihazının optikle ilgili birimi olan F2 kanalı, 640 nm'deki kırmızı ışığın yoğunluğunu ölçmektedir. Ölçüm, ışımanın maksimum olduğu "annealing" fazı sonunda yapılabilmektedir (Şekil 18).



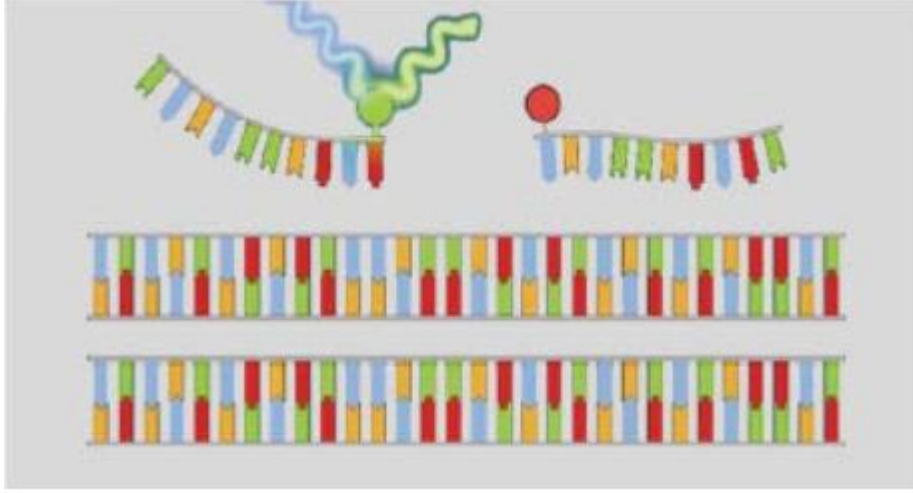
Şekil 18. “Annealing” basamağında, probler hedef DNA dizisine yan yana bağlanır. Birinci boyanın emisyon enerjisi ikinci boyayı eksite eder. Eksite olan ikinci boya da emisyon enerjisi yayar (59).

“Annealing” fazından sonra, sıcaklık artar ve hibridizasyon problemleri başlayan uzama “elongation” aşaması sırasında amplikondan ayrılırlar (Şekil 19).



Şekil 19. “Annealing” basamağından sonra gerçekleşen “elongation” (uzama) basamağının başlamasıyla sıcaklık artışı gerçekleşmekte ve sıcaklık artışıyla hibridizasyon problemleri hedef DNA dizisinden ayrılmaya başlamaktadır (59).

Uzama aşamasından sonra oluşan ampliconlar çift iplikli olduklarından hibridizasyon problemleri ile hibridize olamazlar. Bu durumda, iki prob birbirlerinden uzakta ve serbest halde oldukları için FRET gerçekleşemez (Şekil 20).



Şekil 20. Uzama basamağının ardından çift iplikli ampliconların oluşmasıyla hibridizasyon problemleri serbest hale gelmekte ve birbirlerinden uzakta bulunmaktadır (59).

Erime Eğrisi “Melting Curve” Analizi

Amplifikasyon metodunun gerçek zamanlı olarak görüntülenmesine ek olarak amplifikasyondan sonra erime eğrisi analizi aşamasında diziyeye özgü hibridizasyon problemlerinin tek iplikli DNA hibridizasyonu ile mutasyonların, SNP'lerin belirlenmesini ve gerçek zamanlı olarak görüntülenmesi gerçekleşmektedir. Her çift sarmal DNA (dsDNA), kendine özgü %50'sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan erime sıcaklığı “melting temperature” (T_m) değerine sahiptir. Bu erime sıcaklıkları öncelikle çift sarmal DNA'nın uzunluğuna (Zincirin uzunluğu arttıkça T_m sıcaklığı artar), GC içeriğinin derecesine (GC' den zengin fragmentlerde T_m sıcaklığı yüksektir), zincirler arasındaki bütünlüğün derecesine (Zincirlerden bir tanesinin farklı bir baz içermesi T_m sıcaklığını düşürür) bağlı olarak belirlenmektedir (60). Bu aşamada sıcaklık yavaş yavaş 40°C'den 75°C'ye yükselir. Hibridizasyon problemlerinin DNA zincirine hibridizasyonunu sağlayan kritik sıcaklık (T_m), mutasyon veya SNP'nin var olup olmadığının belirleyicisidir. Herhangi bir baz değişikliğinin oluşmadığı bir durumda, hibridizasyon probu DNA kalıbı ile tam olarak eşleşir. Baz değişikliğinin söz konusu olduğu durumlarda ise hibridizasyon probu DNA kalıbı ile tam olarak eşleşemez. İki eşleşme karşılaştırıldığında baz değişikliğini içermeyen DNA kalıbı, baz değişikliğini içeren DNA kalıbına göre daha yüksek erime sıcaklığı derecesine sahip olmaktadır. İki T_m derecesi arasındaki fark ile DNA zincirinde mutasyon olup olmadığı belirlenebilmektedir. Bu erime eğrisi analizi sonucunda, floresan şiddetinin düşüşüne neden olan sıcaklık derecesine göre değerlendirilerek hastanın o gen için

genotiplendirilmesi yapılmaktadır. Buna göre homozigot wild tip genotipler yüksek sıcaklıkta tek pik, homozigot mutant genotipler düşük sıcaklıkta tek pik, ve heterozigot genotipler ise düşük ve yüksek sıcaklıkta 2 pik oluşturmasına göre 3 farklı genotip belirlenebilmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma öncesinde yerel etik kurul onayı alındı (Ek-1). Bu çalışmada, önceden belirlenen dört grupta analizlerin yapılabilmesi için toplam 200 gönüllü dahil edilmesi planlandı. Çalışma öncesinde oluşturulan gruplar ve gruplarda yer alacak gönüllü sayıları aşağıdaki şekilde belirlendi: **Grup I:** Normal vücut kilosuna sahip ve diyabet olmayan 50 gönüllü ile planlandı. Bu grup için normal kilo aralığı vücut kitle indeksi ile belirlendi. Vücut kitle indeksi (BMI) 18,5-24,9 kg/m² arasında olanlar bu gruba dahil edildi. **Grup II:** Vücut kilosu normal sınırların üzerinde olan kilolu ya da obez olarak sınıflanan (BMI, 25-39,9 kg/m²) ve diyabet hastalığı olmayan 50 gönüllünün bu gruba dahil edilmesi planlandı. **Grup III:** Bu grupta vücut kilosu normal sınırların üzerinde olan (BMI, 25-39,9 kg/m²) ve aynı zamanda T2DM hastalığı olan 50 gönüllü alınması planlandı. **Grup IV:** Bu grupta vücut kilosu normal sınırlar içinde olan ve aynı zamanda T2DM hastalığı olan 50 gönüllü alınması planlandı.

Yapılan planlamaya uygun olarak gönüllülerin belirlenmesi amacıyla Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji Bilim Dalı tarafından değerlendirilen ve T2DM tanısı alan hastalarla görüşüldü. Hastalara çalışmanın amacı açıklandıktan sonra gönüllü olup olmayacakları soruldu. Gönüllü olanlara bilgilendirilmiş olur formu okutulup anlamadıkları kısımlar tekrar açıklandıktan sonra formu imzalayanlar gönüllü olarak çalışmaya dahil edildi. Bu gönüllüler içinde T2DM tanısı alanlar dışında diyabet tanısı almayan ancak vücut kilosu Grup II' ye dahil etmek üzere uygun olanlar ile de görüşülerek bu grubun gönüllüleri bu şekilde oluşturuldu. Gönüllü toplama işlemi 01.06.2011-01.08.2012 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Bu

dönem içerisinde **Grup I**’ de 50, **Grup II**’ de 59, **Grup III**’ de 89 ve **Grup IV**’ te 3 gönüllü toplanabildi. Vücut kilosu normal sınırlarda olan ve aynı zamanda T2DM tanısı almış gönüllü bulunmasında ciddi sıkıntı yaşandı ve Grup IV olarak adlandırdığımız çalışma grubunda sadece 3 uygun olgu dahil edilebildi. Bu nedenle bu olguların verilerine istatistiksel analize dahil edilmemekle birlikte ham veri olarak tablolarda yer verildi.

Çalışma öncesinde gruplara alınacak gönüllüler için dahil etme ve dışlama kriterleri şu şekilde belirlendi: Diyabet hastalarını içermeyen Grup I ve Grup II için T2DM tanısı almamış, iskemik kalp hastalığı, periferik arter hastalığı, felç ve herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan sağlıklı bireyler çalışmaya alındı. Grup I ve Grup II ayrımında gruplar için belirlenen BMI aralıkları kullanıldı. Diyabet hastalarından oluşan Grup III ve Grup IV için T2DM tanısı almış hastalar seçildi. T2DM hastalarının Grup III ve Grup IV’ e dağıtımını ise yine önceden belirlenmiş BMI aralıklarına göre yapıldı.

Hasta ve kontrol gruplarındaki gönüllülerden 10’ar ml periferik kan örnekleri EDTA’lı vakumlu tüplere ve jelli tüplere alındı. Jelli tüpler santrifüj edilerek serum örneklerinin bir kısmı gliserol çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C’de saklandı. Gliserol düzeylerinin ölçümü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında serbest gliserol ölçüm kiti “Biovision Free Glycerol Assay Kit” (K630-100, BiovisionKit, USA) kullanılarak Elisa yöntemi ile yapıldı. Kalan serum örnekleri ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarının Hormon biriminden hizmet alımı gerçekleştirilerek plazma insülin düzeyleri belirlendi (33410, Backman Coulter, USA). EDTA’ lı tüplere alınan kanlardan Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalının Moleküler laboratuvarında DNA saflaştırma kiti (K11796828001, Roche, Almanya) kullanılarak DNA’lar izole edildi. DNA’ların kalitesi %0.8’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek gözlemlendi. DNA miktarları Nanodrop cihazı kullanılarak belirlendi. Elde edilen DNA’lardan V59L (LightSnip rs4008659), A953G (LightSnip rs2989924), C43T (LightSnip rs77284866) ve T279A (LightSnip rs 1867380) polimorfizmlerini belirlemek için “LightCycler FastStart” DNA “Master Plus HybProbe” kiti (03003248001, Roche, Almanya) kullanıldı. Amplifikasyonlar Real-Time-PCR cihazında analiz edildi (LightCycler:2.0 kanal 530, Roche, Almanya).

KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER

Agaroz (IB 70073, Biomax)

Borik Asit (11607,Riedel-dehaen)

DNA Marker seti, 50bç-100bç (Fermentas)
Etanol % 100 (K39634183910, Riedel)
Etidyum Bromit (E1510, Sigma)
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) (E-1633, Sigma)
Magnezyum klorür (R0971, Fermentas)
Proteinaz K (13624300, Roche)

KULLANILAN CİHAZLAR

Agaroz elektroforez tankı (Minicell Primo EC 320)
Derin dondurucu (AEG)
Dijital fotoğraf makinesi (Kodak Easy Share 2330)
Güç kaynağı (EC-105)
Manyetik karıştırıcı (Nüve)
Otoklav (Heraeus)
Otomatik mikro pipetler (ISOLAB)
pH metre (Hanna)
Santrifüj (Allegra X-22R)
Terazi (Sartorius)
Thermal Cyclers (Boeco TS-100)
Vorteks (VELP Scientifica)
Real-Time (LightCycler 2.0)

ÇÖZELTİLER

10xTris Borat Elektroforez (TEB) Çözeltisi (1 litre) pH: 7.4

60.5 gr Tris
3.72 gr Na₂EDTA.2H₂O
30.85 gr borik asit

DNA İZOLASYONU

Hasta ve kontrol gruplarından EDTA'lı tüplere alınan 2 ml kan örneklerinden DNA izolasyonu Roche firmasının "*High Pure PCR Template Preparation Kit*"i kullanılarak elde edildi (K11796828001 Roche, Almanya). Kiti içeriği Tablo 1 'de verilmiştir.

Tablo 5. DNA izolasyon kit içeriği (Roche Diagnostik-Almanya)

Kimyasal	Miktarı	İçeriği
Binding (bağlayıcı) tampon	20 ml	6 M guanidine-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH:4.4
Proteinaz K	90 mg	Liyofilize proteinaz K
İnhibitör uzaklaştırıcı tampon	33 ml	5 M guanidine-HCL, 20 mM Tris-HCl. pH:6.6
Yıkama tamponu	20 ml	20 mM NaCl. 2 mM Tris-HCK pH:7.5
Elüsyon tamponu	40 ml	10 mM Tris, pH:8.5

Yukarıda kit içeriğinde verilen DNA izolasyon setinde bulunan Proteinaz-K, inhibitör uzaklaştırıcı tampon, yıkama tamponu DNA izolasyon kitinin prospektüsünde verilen bilgiler doğrultusunda işlemlere tabi tutuldu. Proteinaz K: Liyofilize proteinaz K'ya 4.5 ml bidistile su eklendi ve çalışma gününe kadar 500'er µl'lik porsiyonlara ayrılarak -20°C'de saklandı. İnhibitör uzaklaştırıcı tampon: 33 ml tampona 20 ml mutlak etil alkol eklendi. Yıkama tamponu: 20 ml yıkama tamponuna 80 ml mutlak etil alkol eklendi.

DNA İzolasyon Protokolü

1. 1,5 ml ependorf tüpü içinde 200 µl EDTA'lı tam kan, bağlanma tamponu ve proteinaz K karıştırıldı ve vortekslendi.
2. +70°C de 10 dk inkübe edildi.
3. Tüpe 100 µl isopropanol eklendi, vortekslendi.
4. Karışım özel filtreli tüplere alındı.
5. 1 dakika 8.000 rpm'de santrifüj edildi. Filtreden geçen karışım atıldı.
6. Filtreli tüpün içine 500 µl inhibitör "uzaklaştırma solüsyonu" eklendi.
7. 1 dakika 8.000 rpm'de santrifüj edildi. Filtreden geçen karışım atıldı.
8. Filtreli tüpün içine 500 µl yıkama solüsyonu eklendi.
9. 1 dakika 8.000 rpm'de santrifüj edildi. Filtreden geçen karışım atıldı.
10. İkinci kez filtreli tüpün içine 500 µl yıkama solüsyonu eklendi.

11. 1 dakika 8.000 rpm'de santrifüj edildi. Filtreden geçen karışım atıldı.
12. Filtreli tüp boşaltıldıktan sonra 10 saniye 12 000 rpm'de santrifüj edildi.
13. Filtreli tüp, yeni bir ependorf tüpü içine yerleştirildi. 72 °C'de bekletilmiş olan elüsyon tampondan 200 µl, filtre tüpe pipetlendi.
14. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Filtre tüpten ayrılan, saf DNA elde edilmiş oldu.

DNA miktarları nanodrop cihazı kullanılarak belirlendi. DNA'ların kalitesi %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek gözlemlendi. Elde edilen DNA örnekleri -20°C'de saklandı.

SERUM GLİSEROL DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Serum gliserol düzeyler "Free Glycerol Assay kit" kullanılarak Elisa yöntemiyle ölçüldü ((K630-100,Biovision,USA). Gliserol yiyeceklerde, içeceklerde, solventlerde, eczacılık ve kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Araştırmalar için gliserol miktarının tayinine çok fazla ilgi duyulmaktadır. Ölçümde, renk ($\alpha=570$ nm) ve ışınım (Ex/Em=535/587 nm) elde etmek için proba reaksiyona giren gliserol enzimatik olarak oksitlenir ve ürün elde edilir. Kit, çeşitli örneklerdeki gliserolün 50 pmol ve 10 nmol aralığını (yada 1-10000µM aralık) algılayabilir.

Reaktiflerin Hazırlanması

Gliserol Prob: Kullanmadan önce 220 µl susuz DMSO içinde çözüldü. -20°C de saklandı, ışık ve nemden korundu.

Gliserol enzim karışımı: 220 µl ölçüm tampon içinde çözüldü ve -20°C de saklandı
Gliserol Ölçüm Protokolü:

a- Standart Eğrisi Hazırlama:

Kolorimetrik ölçüm için, 1mM gliserol standardı oluşturmak üzere 990 µl ölçüm tamponu içine 10 µl gliserol standardı eklendi ve iyice karıştırıldı. Her bir kuyuya standartlar 0, 2, 4, 6, 8, 10 µl eklendi. Gliserol standartları 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/kuyu oluşturmak için her bir kuyu ölçüm tamponu ile 50 µl/kuyu hacme tamamlandı (Tablo 7)

b- Örnek Hazırlama: Test örnekleri 96 kuyuluk levha içine ölçüm tamponu ile final hacim 50 µl/kuyu olacak şekilde hazırlandı.

c- Reaksiyon Karışımı: Örneklerin ve standartların sayıları için yeterli reaktif karıştırıldı. Her bir kuyu için, total 50 µl reaksiyon karışımı hazırlandı.

46 µl ölçüm tamponu

2 µl gliserol prob

2 µl gliserol enzim karışımı

d- Standartları ve örnekleri içeren her bir kuyuya reaksiyon karışımından 50 µl eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika ışıktan korunarak inkübe edildi.

e- Mikrotitre plaka okuyucusunda 570 nm OD de kolorimetrik ölçüm yapıldı (Tablo 7)

f- Hesaplama: Tüm örnek okumalarından 0 gliserol standart değeri çıkarılarak gerçek background elde edildi. Standart eğrisi çizdirildi (OD 570 nm veya floresans okumalarına karşı nmol). Örnek okumaları standart eğriye uygulandı. Daha sonra gliserol konsantrasyonu hesaplandı (Şekil 21).

$$C = \frac{Ga}{Sv} \text{ nmol}/\mu\text{l yada Mm}$$

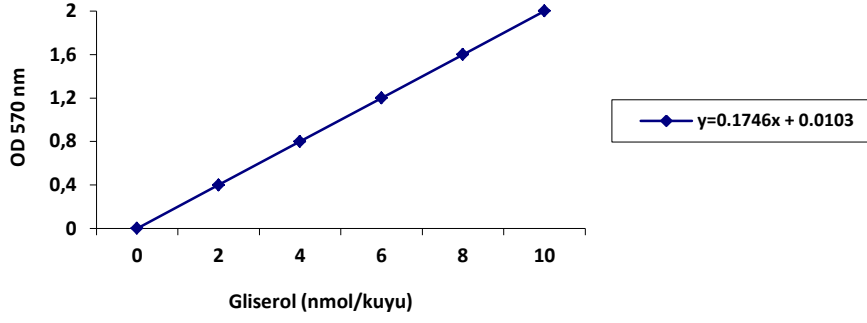
Burada:

Ga, standart eğrinin gliserol miktarıdır.

Sv, örnek kuyularına eklenen örnek hacmidir. Gliserol molekül ağırlığı 92.09 dur.

Tablo 6. Gliserol kit içeriği (Biovision)

Bileşenler	K630-100	Kapak Kodu	Parça numarası
Gliserol Ölçüm Tamponu	25 ml	WM	K630-100-1
Gliserol Prob (liyofilize)	1 vial	Kırmızı	K630-100-2
Dimetilsülfoksit (DMSO, Susuz)	0.4 ml	Kahverengi	K630-100-3
Gliserol Enzim Karışımı (liyofilize)	1 vial	Yeşil	K630-100-4
Standart Gliserol (100mM)	0.2 ml	Sarı	K630-100-5



Şekil 21. Gliserol standart grafiği.

PLAZMA İNSÜLİN DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Serum insülin ölçümleri “immunoassay sistem UniCel DxI 800” cihazında yapıldı (Backman Coulter-USA). Ultrasensitive insülin yöntemi eş-zamanlı tek adım immünoenzimatik “Sandvich” analizidir. Örnek, fare monoklonal anti-insülin fosfataz konjugatı ve fare monoklonal anti-insülin antikor ile kaplanmış paramagnetik partiküller reaksiyon süresince eklidir (Backman Coulter-7,8). İnsülin molekülünde farklı antijenik bölgeler ile konjugat reaksiyona girerken solid fazdaki antikora serum ya da plazma insülini bağlanır. Reaksiyon kabında inkübasyondan sonra, yıkama sırasında bağlı olmayan materyaller uzaklaştırılırken bağlı olanlar manyetik alanla tutulur. Sonra “ lumi-Phos 530 kemilüminesans substrat” kaba eklenir ve açığa çıkan ışıma luminometre ile ölçülür. Işıma ürünleri örnekteki insülin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Örnekteki analit miktarı, çok noktalı kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanır.

GERÇEK-ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Gerçek zamanlı PCR hedef DNA'daki nükleotid dizisi bilinen AQP7 geninin A953G ve V59L bölgeleri ile AQP9 geninin T279A ve C43T bölgelerini içeren spesifik primerler ile amplifiye edilerek polimorfizmlerinin tespit edilmesi amacıyla kullanıldı. Analiz denatürasyon, amplifikasyon, “melting” erime ve “cooling” soğuma olmak üzere dört basamakta yapıldı. Çalışmaya başlarken *Taq* polimeraz, primer ve prob, dört çeşit deoksiribonükleotid fosfat (dNTP), belirli derişimde magnezyum klorür ($MgCl_2$) ve üzerinde çalışılacak DNA'dan oluşan karışım hazırlandı (Tablo 8).

Tablo 7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) Protokolü

15 Örnek (+1) İçin (10µl):	Miktar
Saf su	104.0 µl
Prob Set	8.0 µl
Ana karışım	32.0 µl
Toplam	144.0 µl/16 = Her tüpe 9 µl

Denatürasyon basamağında sıcaklık artırıldı ve DNA zincirindeki nükleotidler arasındaki bağlar koparılarak amplifikasyon işlemine hazır hale getirildi. DNA denatüre edildikten sonra oligonükleotid yapısındaki primerler sentezlenecek hedef bölgeyi belirleyecek şekilde ayrılan DNA zincirlerine yapıştılar. Termofilik bir bakteri olan “*Thermus aquaticus*”’dan saflaştırılan Taq polimeraz enzimi yardımıyla belirlenen bölge dört çeşit dNTP kullanılarak sentezlendi. “Annealing” (uzama) adı verilen sentez işlemi sırasında diziye uygun olarak sentezlenmiş prob 5' ucu tarafına ve arada en fazla 5 nükleotidlik mesafe kalacak şekilde yerleşti. Amplifikasyon işlemi ortalama 40–50 kez tekrar edilerek yaklaşık 2^{40-50} sayıda ürün elde edildi (Tablo 9).

Tablo 8. Denatürasyon Programı

Döngü Programı Verileri	Değer
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon Zamanı	10:00
Sıcaklık Değişim Hızı (°C/saniye)	20.0

Amplifikasyon için “LightCycler FastStart DNA Master PLUS HybProbe” (Roche Applied Science) kiti kullanıldı. Amplifikasyonlar Gerçek zamanlı PCR cihazı olan “LightCycler2.0” cihazında gerçekleştirildi (Tablo 10,11).

Tablo 9. Amplifikasyon Programı

Döngü Programı Verileri	Değer	
Döngü Sayısı	45	
Analiz Modu	Ölçme	
Sıcaklık Hedefi	Segment 1	Segment2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon Zamanı	0	20
Sıcaklık Değişim Hızı (°C/saniye)	20.0	10.0
İkinci Hedef Sıcaklık (°C)	0	0
Basamak Ölçüsü	0	0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0	0

Tablo 10. Soğutma Programı

Döngü Programı Verileri	Değer
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon Zamanı	30
Sıcaklık Değişim Hızı (°C/saniye)	20.0
İkinci Hedef Sıcaklık (°C)	0
Basamak Ölçüsü	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0

Floresan boyalarla işaretli hibridizasyon problemleri ile floresan rezonans enerji transferi (FRET) yöntemi kullanıldı. PCR reaksiyonu sırasında çoğaltma işlemi gerçekleştikçe TaqMan probdan salınarak serbest kalan FAM boyası gerçek zamanlı PCR cihazı tarafından kaydedilerek her örneğin başlangıç konsantrasyonuna göre vermiş olduğu Ct değerleri yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı. Çağalma Light Cycler 2.0 cihazının bilgisayarından gerçek zamanlı olarak da izlendi. Floresans kanal ayarları, F1/1

olarak kullanıldı. Sonuçlar Ligt Cyclers 2.0 yazılım programı ile analiz edilerek değerlendirildi.

Primer Dizinleri

LightSNIP rs 4008659 AQP7 (Roche Diagnostics), LightSNIP rs29889924 AQP7 (Roche Diagnostics), LightSNIP rs 77284866 AQP9 (Roche Diagnostics), LightSNIP rs18673080 AQP9 (Roche Diagnostics)) “simple probe “ları kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen verilerin analizinde sayısal değişkenler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Tanımlayıcı istatistik sonuçları frekans ve yüzde değerleri olarak ifade edildi. Ölçüm değişkenlerinin normal dağılıma uygunluğu Tek Örnek Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda kantitatif değişkenlerde parametrik olanlar için ANOVA testi non-parametrik olanlar için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Post hoc testlerde uygunluk durumuna göre Tukey testi veya Mann Whitney U testi kullanıldı. Kalitatif değişkenler ise ki-kare testi ile değerlendirildi. AQP7 ve AQP9 polimorfizmlerinin gruplar arasındaki farklı frekanslarının karşılaştırılmasında çapraz tablolar ve ki-kare testleri kullanıldı. Tüm istatistik analizlerde 0,05 ve daha küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma gruplarının demografik, antropometrik ve biyokimyasal özellikleri Tablo 1’de verilmiştir. Çalışma gruplarının yaş ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık gösterdi. Kontrol grubu en genç grubu oluştururken hem diyabet hem de obez grup daha yaşlı çalışma grubuydu. Gruplar arasında cinsiyet dağılımı açısından anlamlı fark saptanmadı. Grup 1 (Kontrol) ve Grup 2 (Obez) diyabet hastalığı olmayan bireylerden oluştuğu için ve Grup 3 (Diyabet + Obez) tamamen klinik ve laboratuvar kriterler ile doğrulanmış diyabet hastalarını kapsadığından bu üç grupta kan glukoz ortalamaları beklendiği şekilde anlamlı düzeyde birbirinden farklı bulundu. Grup 1 ve 2 kan glukoz düzeyleri normal sınırlarda bulunurken Grup 3 kan glukoz düzeyi normalin üzerindeydi. Benzer şekilde Grup 1 normal kilolu bireyleri, Grup 2 ve Grup 3 obez hastaları içerdiği için BKİ ortalamaları da anlamlı düzeyde birbirinden farklı bulundu. Çalışmanın ana eksenini oluşturan AQP7 ve AQP9 kanalları su yanısıra gliserol geçişine de izin vermektedir. Grupların gösterdiği polimorfizm özellikleri göz önünde bulundurulmadan yapılan karşılaştırmada kan gliserol düzeylerinde de anlamlı derecede fark saptandı. Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) düzeyleri ise gruplar arasında benzer özellikler gösterdi (Tablo 11).

Gruplar arasında insülin ortalamalarının karşılaştırılması, anlamlı düzeyde farklılık olduğunu gösterdi. İstatistik analiz sonuçlarına göre en düşük insülin düzeyleri sağlıklı kontrol grubunda görülürken Grup 2 ve Grup 3’te daha yüksekti. İnsülin düzeylerindeki yüksekliğin obeziteye bağlı görülen insülin direncindeki artıştan kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

Tablo 11. Çalışma gruplarının demografik, antropometrik ve biyokimyasal özellikleri

	KONTROL N=49	OBEZ N=60	T2DM+OBEZ N=89	P değeri
Yaş, yıl	36,6 ±10,8	47,1 ±10,5	53,7 ± 8,5	<0,001
Cinsiyet, E/K	18/31	29/31	33/56	>0,05
BMI, kg/m²	22,7 ±1,6	31,4 ±4,8	31,7±6,4	<0,001
Glukoz*, mg/dL	90,0 ±9,1	97,6 ± 10,2	148,2 ±66,2	<0,001
KOL, mg/dL	175,0 ±36,7	196,8 ±37,1	185,7±37,0	<0,02
TG, mg/dL	114,3 ±65,1	150,8 ±84,8	190,9 ±100,1	<0,001
HDL, mg/dL	51,5 ±13,1	49,2 ±13,4	46,0 ±12,6	>0,05
LDL, mg/dL	115,4 ±33,0	132,6 ± 34,8	124,5 ± 35,4	>0,05
Gliserol,µmol/mL	0,68 ±0,28	0,79 ±0,38	0,97 ± 0,44	<0,001
İnsülin, µIU/mL	7,21 ±6,61	13,71 ±17,03	18,21 ± 21,88	<0,001

Tüm veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. **Kısaltmalar:** **BMI**, vücut kitle endeksi; **KOL**, kolesterol; **TG**, trigliserid; **HDL**, yüksek dansiteli lipoprotein; **LDL**, düşük dansiteli lipoprotein. *Açlık kan şekeri

Yağ dokusunda ifade edilerek dokudan gliserol çıkışı sağlayan AQP7'nin A953G ve V59L adları verilen iki gen polimorfizmi incelendi. Bu polimorfizmlerin çalışma grupları arasında dağılımları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Çalışma gruplarında farklı AQP7 polimorfizmlerinin dağılımları Tablo 12'de verilmiştir.

AQP7 "promoter" bölgelerinde nükleotid değişimi ile saptanan A953G polimorfizmi sonuçlarına bakıldığında grupları oluşturan bireylerin %50-60'ında AG genotipi görülürken, ikinci sıklıkta AA (yaklaşık %25-30) ve üçüncü sıklıkta GG (yaklaşık %15) genotipleri görüldü. Çalışmada, AQP7 A953G genotipleme, erime pik "Melting peak" sayısı ve Tm dereceleri (°C) Tablo 13' de gösterildi. Bu erime pik analizi sonucunda, floresan şiddetinin düşüşüne neden olan sıcaklık derecesine göre değerlendirilerek hastanın o gen için genotiplendirilmesi yapılmaktadır. Buna göre homozigot "wild" tip yüksek sıcaklıkta tek pik, homozigot mutant tip düşük sıcaklıkta tek pik, ve heterozigot ise düşük ve yüksek sıcaklıkta 2 pik oluşturmasına göre 3 farklı genotip belirlenebilmektedir. Bu aşamada sıcaklık yavaş yavaş 40°C'den 75°C'ye yükselir. Hibridizasyon problemlerinin DNA zincirine hibridizasyonunu sağlayan Tm dereceleri, SNP'nin var olup olmadığının belirleyicisidir.

Tablo 12. Çalışma gruplarında farklı AQP7 polimorfizmlerinin dağılımları

	KONTROL N=49	OBEZ N=60	T2DM+OBEZ N=89
AQP7*			
A953G			
AA, n(%)	13(27,1)	16(28,6)	15(28,8)
AG, n(%)	28(58,3)	29(51,8)	29(55,8)
GG, n(%)	7(14,6)	11(19,6)	8(15,4)
V59L			
CC n(%)	49(100)	48(99)	63(100)
GC n(%)	0(0)	1(1)	0(0)
GG n(%)	0(0)	0(0)	0(0)

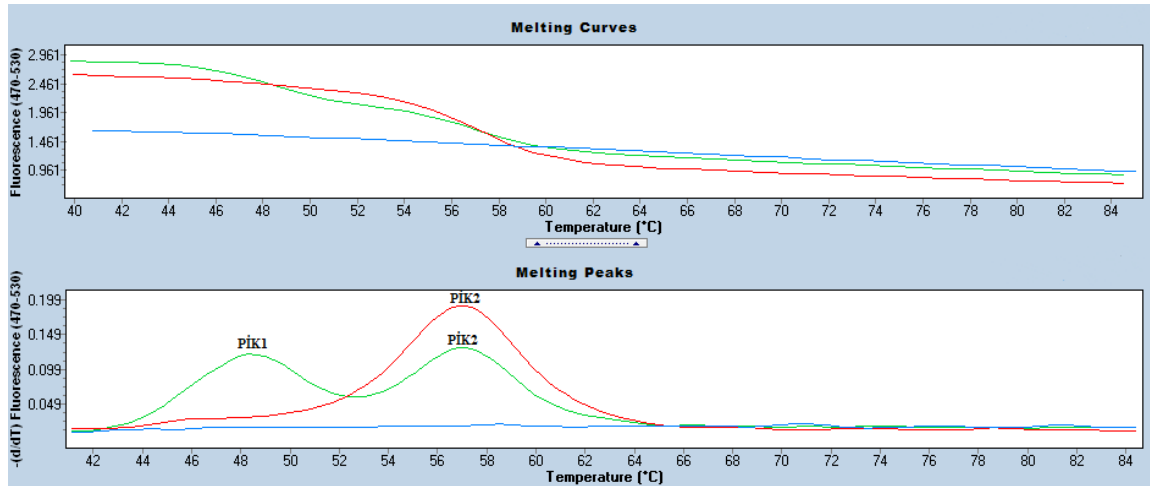
*Polimorfizm çalışmasına dahil edilen AQP7 ile ilgili 2 gen bölgesi (A953G ve V59L) çalışma grupları arasında dağılımları bakımından istatistiksel anlamlılık görülmemiştir.

Tablo 13. AQP7 izlenen A953 genotiplenmesi, Tm ve Pik sayıları

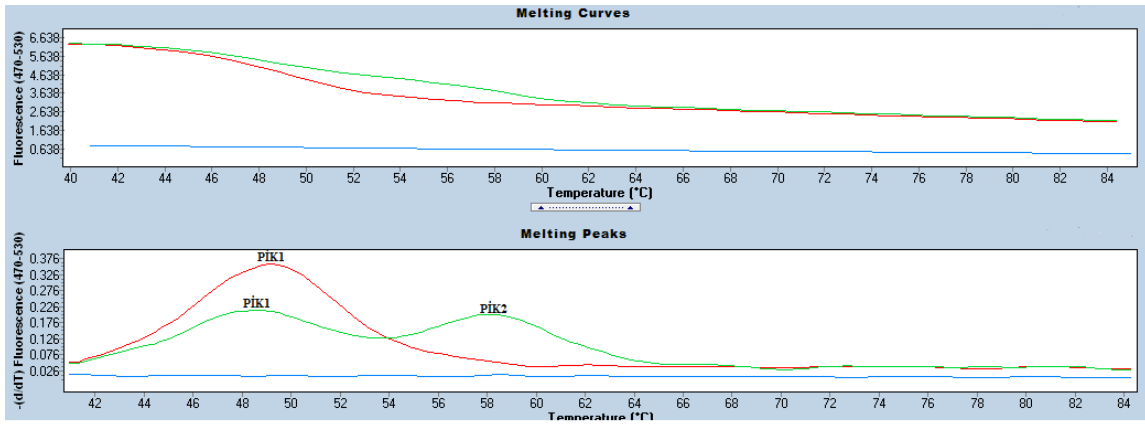
Genotip	Erime Pik Sayısı	Erime Pik Tm	Δ Tm
Allel (G)	1	49,88 °C	-
Heterozigot	2	49,88 °C + 58,76 °C	8,88 °C
Allel (A)	1	58,76 °C	-

Gerçek zamanlı-PCR ile A953G’de elde ettiğimiz bulgular; Tablo 3’de belirtilen genotiplenmelerin Tm ve erime pik sayılarının görüntüleri, allel A (homozigot “wild” tip) ve heterozigot Şekil 22’de, allel G (homozigot mutant tip) ve heterozigot Şekil 23’de verildi.

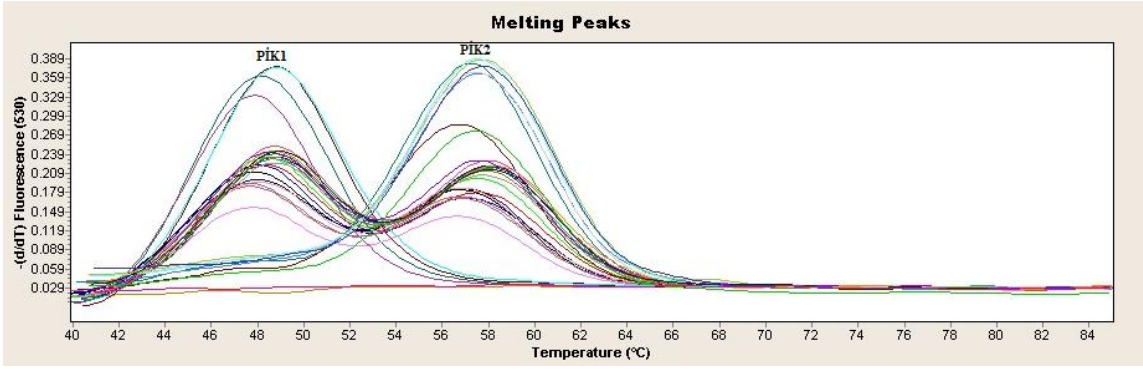
AQP7 geninin A953G genotiplerinin Tm ve erime pik sayılarının allel A, allel G ve heterozigot değerlerinin gerçek zamanlı-PCR görüntüleri Şekil 24’de gösterildi. Şekilde de görüldüğü gibi bir seferde çalışılan örneklerin (32 olgu) toplu biçimde grafiği alındığı zaman en çok AG geotipi görülürken ikinci sıklıkta AA ve en az GG genotipi elde edilmiştir.



Şekil 22. AQP7 geninin (A953G) genotip örneğinin erime eğrisi (melting curve) ve erime pikleri (melting peak) analiz sonucu. Şekilde hastanın örnekleri (kırmızı ve yeşil eğriler) ile bir negatif kontrol (mavi eğri) gösterilmiştir. Yeşil eğri ile gösterilen örnekte hem G hem de A allelinin varlığını gösteren (AG heterozigot) 2 adet pik (PİK 1 ve PİK 2) elde edilirken, kırmızı eğride sadece A allelinin varlığını gösteren 1 adet pik (PİK 2) görüldü.



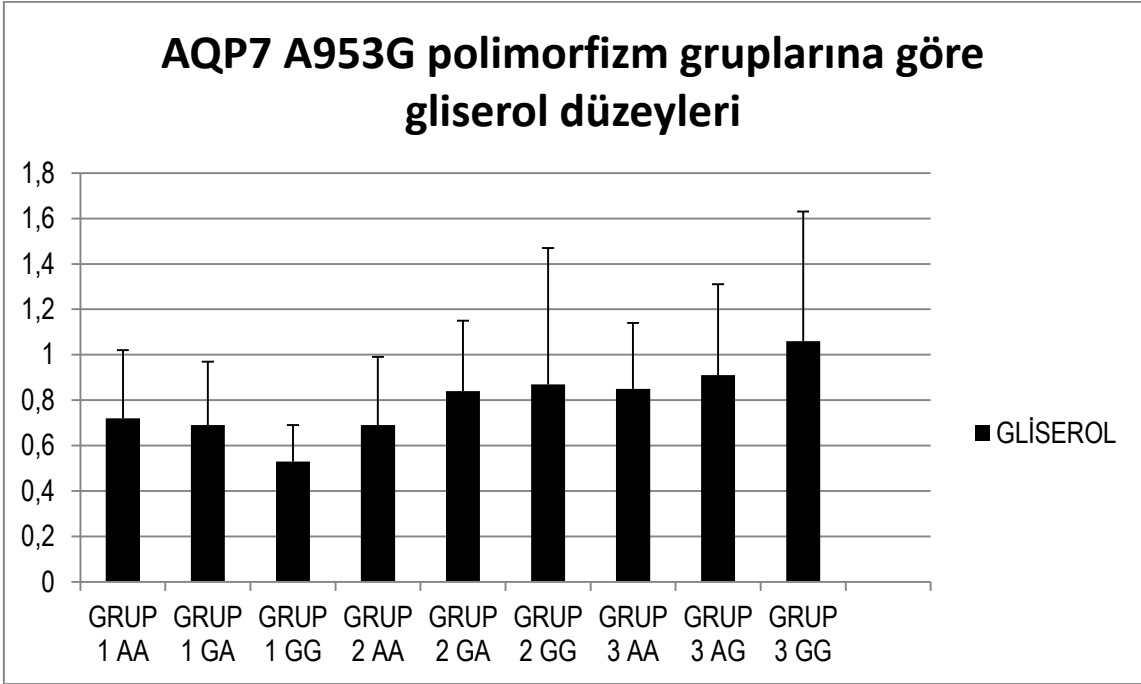
Şekil 23. AQP7 geninin (A953G) genotip örneğinin erime eğrisi (melting curve) ve erime pik (melting peak) analiz sonucu. Şekilde hastanın örnekleri (kırmızı ve yeşil eğriler) ile bir negatif kontrol (mavi eğri) gösterilmiştir. Kırmızı eğride sadece G allelinin varlığını gösteren 1 adet pik (PİK 1) görülürken, Yeşil eğri ile gösterilen örnekte hem G hem de A allelinin varlığını gösteren (AG heterozigot) 2 adet pik (PİK 1 ve PİK 2) elde edilmiştir.



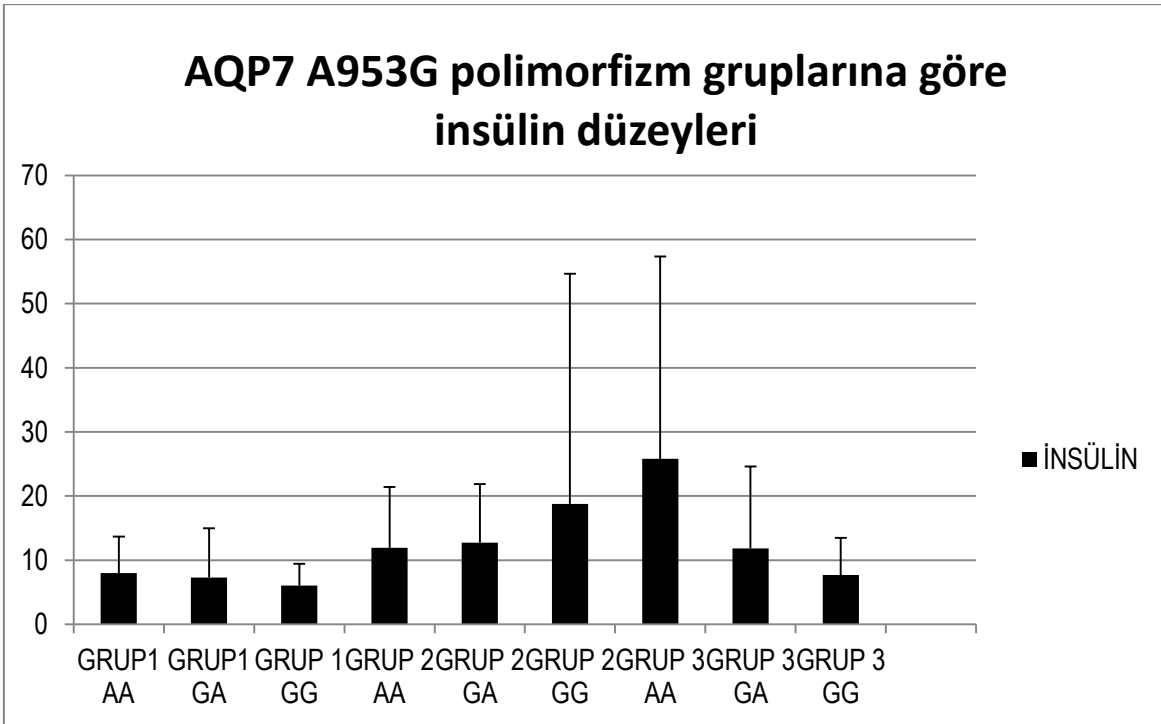
Şekil 24. AQP7 geninin (A953G) genotipinin erime pikleri analiz sonucu. Allel G (PIK1), Allel A (PIK2) ve heterozigot AG (PIK1ve PIK2)

AQP7'nin A953G gen polimorfizmleri gruplar arasında plazma gliserol ve insülin değerleri yönünden karşılaştırıldı. Plazma gliserol değerleri çalışma grupları arasında karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı bulunmasına rağmen, bu karşılaştırma A953G polimorfizmleri temel alınarak farklı genotipler arasında yapıldığında istatistiksel bakımdan anlamlı fark saptanmadı (Şekil 25). Bu sonuç, A953G gen bölgesinin farklı genotiplerini taşıyan bireylerde plazma gliserol düzeylerinin birbirine benzer olduğunu göstermektedir. Diğer bir deyişle, AQP7 kanalını kodlayan gen bölgesinin farklı genotiplerinin varlığının kanalın gliserol taşıma işlevinde bir farklılığa yol açmadığını ve dolayısıyla gliserol düzeylerini etkilemediğini düşündürmektedir.

Aynı şekilde plazma insülin değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında Grup 2 ve Grup 3'de Grup 1'e göre anlamlı olarak yüksek bulunmasına rağmen A953G polimorfizmleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark saptanmadı (Şekil 26). Şekil 5 dikkatle incelendiğinde Grup 3'de AA, GG ve AG alt gruplarının insülin ortalama değerlerinin birbirinden farklı olduğu AA (homozigot "wild" tip) genotipi en yüksek insülin değerleri gözükürken GG (homozigot mutant tip) ve AG (heterozigot) genotiplerinde daha düşük insülin değerleri görüldü. Bu farklılığın alt gruplarda BMI farklılığından kaynaklanabileceği düşüncesi ile BMI bakımından alt grup karşılaştırmaları yapıldı. Bu karşılaştırmalarda fark saptanmadı. Sonuçta Grup 3'de insülin değerlerindeki farklılığın genotip ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Ancak, bunu test etmek için daha büyük çalışma grubu ile ve farklı metodoloji ile planlama yapmak gereklidir.



Şekil 25. AQP7 A953G polimorfizm gruplarına göre gliserol düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Grup içi karşılaştırmalarda Grup 1 $p > 0,358$, Grup 2 $p > 0,255$, Grup 3 $p > 0,743$.

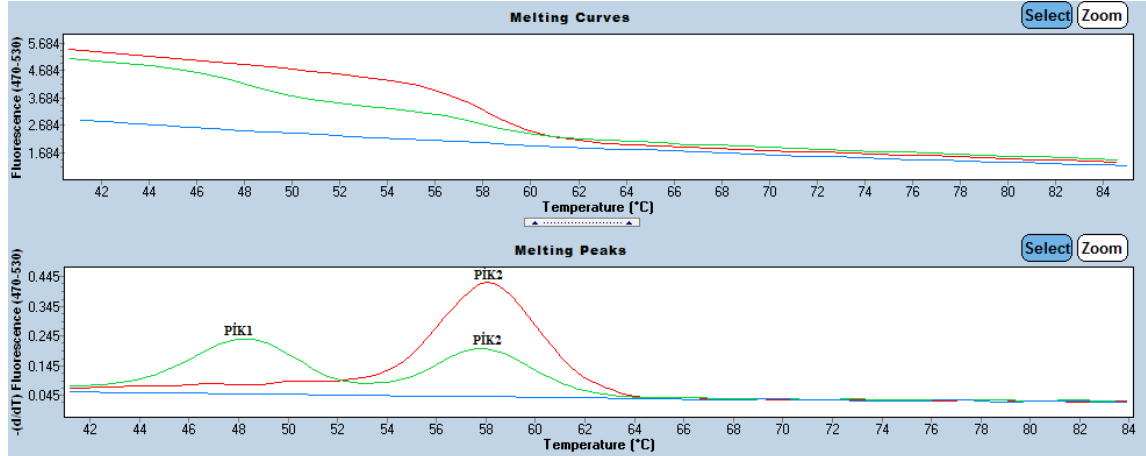


Şekil 26. AQP7 A953G polimorfizm gruplarına göre insülin düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Grup içi karşılaştırmalarda Grup 1 $p > 0,716$, Grup 2 $p > 0,386$, Grup 3 $p > 0,129$.

AQP7 geninin 2. gen bölgesi V59L genotiplenmesi, erime pik sayısı ve Tm dereceleri (°C) Tablo 14’ de gösterildi. Tablodaki bilgiler ışığında allel C (homozigot “wild” tip) allel G (homozigot mutant tip) ve heterozigot GC içermektedir. V59L genotiplenmesi ekson 4’de 347. C nükleotidinin yerine G (C→G) gelmesi sonucunda 59. pozisyonda lösin yerine valin aminosidinin geçmesine neden olur. AQP7 V59L polimorfizmleri bakımından Grup 1 ve Grup 3’ü oluşturan bireylerin tümünde (%100) CC genotipi saptanırken Grup 2’de sadece bir bireyde GC genotipi, ve diğerlerinin tümünde yine CC genotipi saptandı (Şekil 27). V59L bakımından katılımcıların hiçbirinde GG genotipi saptanmadı.

Tablo 14. AQP7 izlenen V59L genotiplenmesi, Tm ve Pik sayıları

Genotip	Erime Pik Sayısı	Erime Pik Tm	Δ Tm
Allel (G)	1	49,43 °C	-
Heterozigot	2	49,43 °C + 58,81 °C	9,38 °C
Allel (C)	1	58,81 °C	-



Şekil 27. AQP7 geninin (V59L) genotiplenmesinin erime sıcaklığı (melting curve) ve erime pikleri (melting peak) analiz sonucu. Şekilde hastanın örnekleri (kırmızı ve yeşil eğriler) ile bir negatif kontrol (mavi eğri) gösterilmiştir. Yeşil eğri ile gösterilen örnekte hem G hem de C allelinin varlığını gösteren (GC heterozigot) 2 adet pik (PİK 1 ve PİK 2) elde edilirken, kırmızı eğride sadece C allelinin varlığını gösteren 1 adet pik (PİK 2) görüldü.

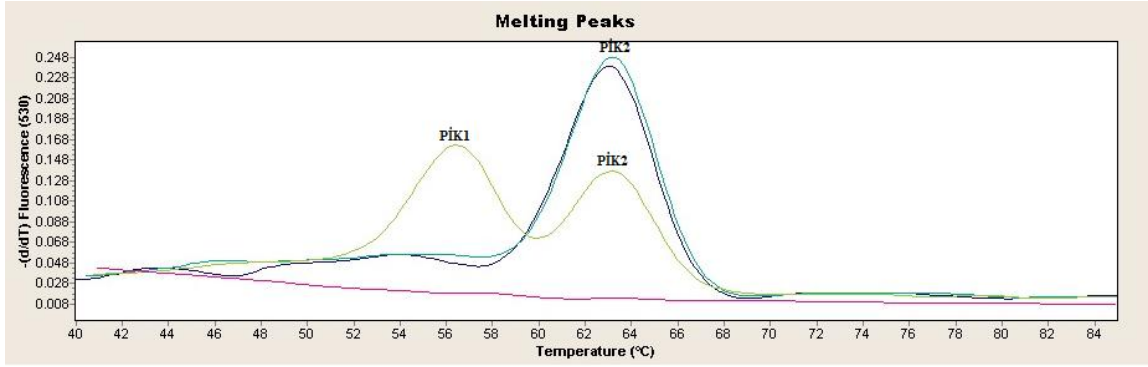
AQP9 geninin iki gen bölgesi T279A ve C43T genotiplerinin polimorfizmlerinin dağılımları Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15. Çalışma gruplarında farklı AQP9 polimorfizmlerinin dağılımları

	KONTROL	OBEZ	T2DM+OBEZ
	N=49	N=60	N=89
AQP9*			
T279A			
GG n(%)	42(91,3)	19(95)	60(90,9)
AG n(%)	4(8,7)	1(5)	6(9,1)
AA n(%)	0(0)	0(0)	0(0)
C43T			
TT n(%)	48(100)	56(100)	84(100)
TA n(%)	0(0)	0(0)	0(0)
AA n(%)	0(0)	0(0)	0(0)

*Polimorfizm çalışmasına dahil edilen AQP9 ile ilgili 2 gen bölgesi (T279A ve C43T)’nin çalışma grupları arasında dağılımları bakımından istatistiksel anlamlılık görülmemiştir.

T279A genotipleme AQP9 geninin 50874. G nükleotidinin yerine A (G→A) gelmesi sonucunda 279. pozisyonda treonin yerine alanin aminoasidinin geçmesine neden olur. T279A polimorfizmi açısından bakıldığında her üç grupta da olguların büyük çoğunluğu GG (%90-95) genotipini gösterdi. GA (%5-10) genotipi daha az sayıda görüldü. AA genotipleme ise üç çalışma grubunun hiçbirinde yani çalışılan toplam 198 bireyin hiçbirinde saptanmadı. AQP9 geninin V279A gen polimorfizmi için elde ettiğimiz genotiplemelerin Tm ve erime pik sayılarının görüntüleri, Şekil 28’de gösterildi. AQP9 geninin (T279A) genotiplemesinin erime pik analiz sonucu 2 hasta ve 1 kontrolde gösterilmiştir. İki hastanın örnekleri mavi ve açık yeşil eğriler ile ve negatif kontrol mor eğri gösterilmiştir. Açık yeşil eğri ile gösterilen örnekte hem A hem de G allelinin varlığını gösteren (AG heterozigot) 2 adet pik (PİK 1 ve PİK 2) elde edilirken, mavi eğride sadece G allelinin varlığını gösteren 1 adet pik (PİK 2) görüldü.



Şekil 28. AQP9 geninin (T279A) genotiplemesinin erime pik (melting peak) analiz sonucu. Şekilde hastanın örnekleri (mavi ve açık yeşil eğriler) ile bir negatif kontrol (mor eğri) gösterilmiştir. Açık yeşil eğri ile gösterilen örnekte hem A hem de G allelinin varlığını gösteren (AG heterozigot) 2 adet pik (PİK 1 ve PİK 2) elde edilirken, mavi eğride sadece G allelinin varlığını gösteren 1 adet pik (PİK 2) görüldü.

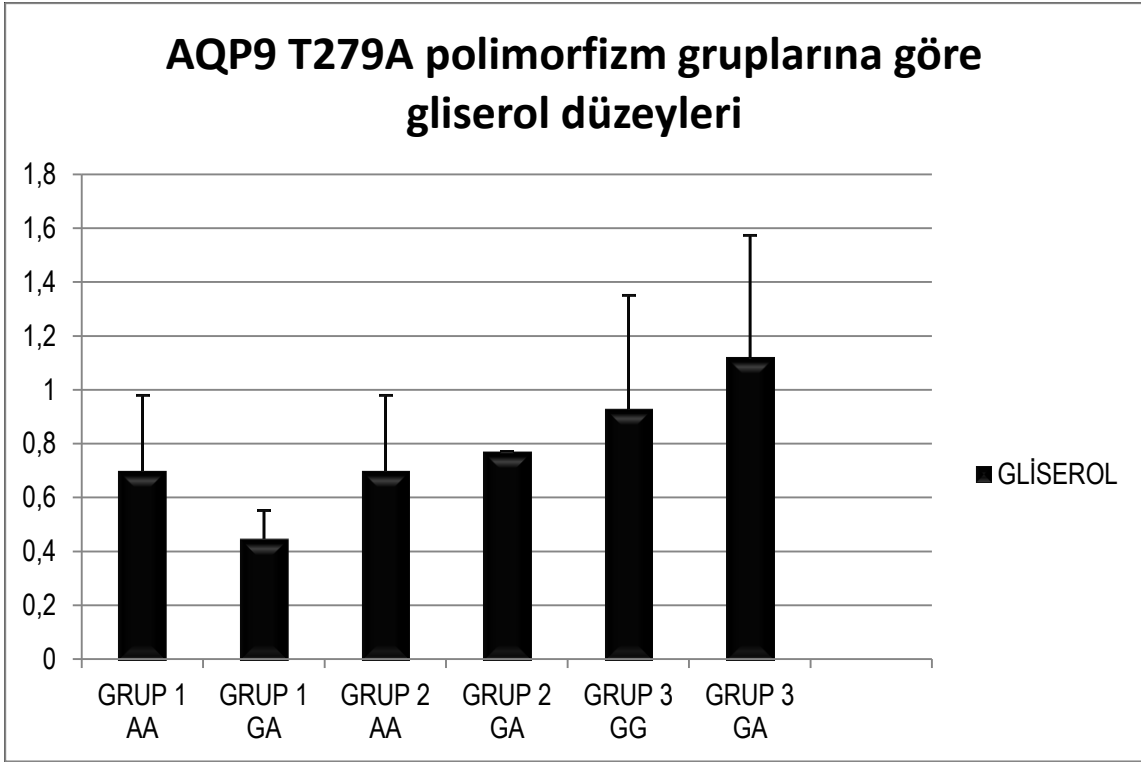
AQP9 geninin T279A gen polimorfizmleri gruplar arasında plazma gliserol ve insülin değerleri yönünden karşılaştırıldı. Plazma gliserol değerleri gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunmasına rağmen T279A polimorfizmleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 29). Aynı şekilde insülin değerleri ile karşılaştırıldığı da fark bulunamadı (Şekil 30).

Tablo 16’da gerçek zamanlı-PCR ile T279A polimorfizminin belirtilen genotiplemelerin Tm ve erime pik sayılarının görüntüleri verildi. Tablodaki bilgiler ışığında allel G (homozigot “wild” tip), allel A (homozigot mutant tip) ve heterozigot AG içermektedir.

Tablo 16. AQP7 izlenen T279A genotiplemesi, Tm ve Pik sayıları

Genotip	Erime Pik Sayısı	Erime Pik Tm	Δ Tm
Allel (G)	1	57,94 °C	-
Heterozigot	2	57,94 °C + 64,47 °C	6,53 °C
Allel (C)	1	64,47 °C	-

C43T polimorfizmi bakımından ise çalışılan tüm bireylerin TT genotipi gösterdiği görüldü. Bu durum çalışma gruplarına dahil edilen birey sayısının nispeten küçük olmasından kaynaklanabilir.

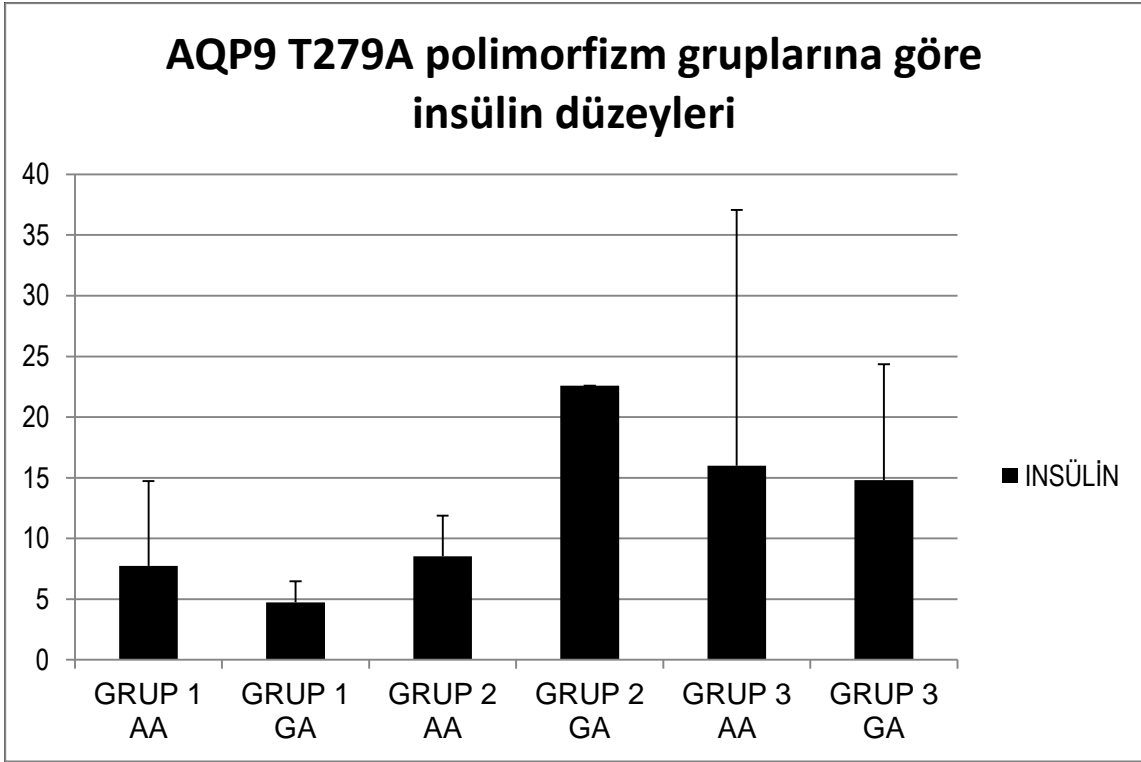


Şekil 29. AQP9 T279A polimorfizm gruplarına göre gliserol düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Grup içi karşıştırmalarda Grup 1 $p > 0,054$, Grup 2 $p > 0,795$, Grup 3 $p > 0,354$.

C43T bölgesine ait polimorfizmlerde ise çalışılan tüm bireylerde sadece TT saptanırken TA ve AA polimorfizimleri üç çalışma grubunun da hiçbir bireyinde saptanmadı. Gerçek zamanlı-PCR ile C43T’de elde edilen bulguların Tm ve erime pik sayılarının görüntüleri Tablo 17’de gösterildi.

Tablo 17. AQP9 geninin VC43T genotiplemesi, Tm ve Pik sayıları

Genotip	Erime Pik Sayısı	Erime Pik . Tm	ΔTm
Allel (G)	1	59,88 °C	-
Heterozigot	2	59,88 °C + 66,21 °C	6,33 °C
Allel (T)	1	66,21 °C	-



Şekil 30. AQP9 geni T279A polimorfizm gruplarına göre insülin düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Grup içi karşılaştırmalarda Grup 1 $p > 0,339$, Grup 2 $p > 0,099$, Grup 3 $p > 0,517$.

Sonuçta çalışma grupları arasında AQP9 geninin T279A ve C43T polimorfizmlerinin dağılımı bakımından anlamlı fark saptanmadı. Bu bulgular AQP7 geninin A953G ve V59L gen polimorfizmleri ile AQP9 geninin T279A ve C43T polimorfizmlerinin obez, obez+T2DM ve non-obez+non-T2DM gruplarda farklı dağılıma sahip olmadığını göstermektedir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, obez ve/veya diyabet hastalarında AQP7 geninin A953G ve V59L genotipleri ile AQP9 geninin T279A ve C43T genotipleri, obezitesi ve diyabet hastalığı olmayan kontrollerden farklı dağılım göstermedi. Yağ dokusunda AQP7 ifadesinin diğer dokulardan daha fazla olduğu, ayrıca testis, epididim, gastrointestinal kanal, iskelet kası, kalp, böbrek ve iç kulakta da bulunduğu gösterilmiştir (9,46,61). İnsan AQP9 ifadesinin de karaciğer, lökosit, akciğer ve dalakta mevcut olduğu gösterilmiştir (4,13). Obezite, gelişmiş ülkelerde oldukça yaygın olarak görülen, çevresel ve genetik faktörlerin etkilediği multifaktöriyel bir hastalıktır. Halen dünyada 250 milyon obez yetişkin ve en az 500 milyon da kilolu insan bulunduğu tahmin edilmektedir. Obez ve kilolu vakaların prevalansındaki bu artışın nedeni olarak, beslenmede yüksek enerjili besinlerin tüketilmesi, günlük kişisel işlerde ve mesleki aktivitelerde harcanan enerjinin azalması görülmektedir. DSÖ verilerine göre fazla kilo ve obezite, Avrupa'daki yetişkinlerde T2DM vakalarının %80'inden, iskemik kalp hastalıklarının %35'inden ve hipertansiyonun %55'inden sorumludur ve her yıl 1 milyondan fazla ölüme neden olmaktadır (2,30). Yetişkin erkeklerde vücut ağırlığının ortalama %15-20'sini, kadınlarda ise %25-30'unu yağ dokusu oluşturmaktadır (29,30). Erkeklerde ve kadınlardaki yağ dokusu oranları ortalaması aşıldığında kiloluluk, daha da artması durumunda obezite söz konusudur (27,32).

T2DM, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasının bozuklukları ile karakterize bir hastalıktır. DSÖ'ye göre 2025 yılında dünyada 300 milyon kişiyi etkileyeceği tahmin edilmektedir. Bu hastalıkta pankreasın β hücrelerinde insülin hormonu salgısı normal veya normalden yüksek olabilir, ancak periferik insülin kullanımında direnç varlığı söz

konusudur (5,6). Obezite ve T2DM hastalıklarında artmış morbidite ve mortalite riskine yol açan metabolik değişiklikler obez kişilerin yağ dokularında ortaya çıkan fonksiyonel değişikliklerle de ilişkilendirilmektedir (4,62). Yağ dokusunun bir endokrin organ olarak fonksiyon gösterdiği ve farklı metabolik yolların düzenlenmesinde rol oynadığını gösteren bulgular giderek artmaktadır. Enerji homeostazının sürekliliği için yağ dokusu açlık anında enerji desteğinde önemli rol oynar ve uzun açlık hallerinde bireyin hayatta kalmasına katkıda bulunur. Bunu da TG'leri hidrolize ederek çok kısa bir sürede dolaşıma serbest yağ asidi ve gliserol kazandırarak gerçekleştirir (63). Ancak günümüzde, özellikle endüstriyel ülkelerde yaşam tarzı değişiklikleri ile birlikte besin alımının artması ve egzersiz eksikliği aşırı yağ birikimine sebebiyet vermektedir (64-66). Bu sosyo-çevresel değişiklik, genelde metabolik sendromlar olarak kabul edilen diyabet, hiperlipidemi, hipertansiyon ve ateroskleroz gibi yaşam tarzı kaynaklı rahatsızlıklara hem sebep olmakta hem de bunları arttırmaktadır. Bu alandaki güncel araştırmalar göstermektedir ki, metabolik sendromların patogenezi, yağ dokusu yapı bozukluğu ile eşleştirilmektedir (67,68). Gliserol üretimi ve gliserolün yağ dokusundan karaciğere aktarımı, glukoz homeostazının anahtar düzenleyicisidir. Gliserolün yağ dokusundan karaciğere aktarımı, yağ dokusunda AQP7 ve karaciğerde AQP9 kanallarının ifadelerinin koordine düzenlenmesi ile sağlanmaktadır (10,69). Açlık durumunda, yağ dokusunda lipoliz ve karaciğerde glukoneogenez başlar. Lipoliz esnasında plazma insülinin azalması ve artmış katekolemin uyarısıyla yağ dokusunda gliserol üretimi hızlı bir şekilde artar. Transkripsiyon ve translokasyon olayları sonucunda yağ dokusu içinde depo edildiği veziküllerde paketli duran AQP7 hücre membranına hareket eder. Hücre membranı ile kaynaşarak gliserolün hücre dışına salınmasını sağlar. AQP7 gliserol kanalının hücre içi ozmotik basınçtaki ani artışı engellediği bilinmektedir (4,70). Beslenme döneminde ise, besin alımı sonrası artan plazma insülini, yağ dokusunda lipolizin lipogeneze dönüşmesini sağlar. GLUT4 yağ dokusu plazma membranına transloke olur ve hücre içine glukoz alınması ile yağ dokusu AQP7 mRNA seviyeleri besin alımı sonrası azalır (8,71). Karaciğerdeki AQP9 ifadeleri de dolaşımdaki gliserol konsantrasyonlarının azalması sebebiyle baskılanır (4,72,73).

Miranda ve ark. (10,69) gliserol metabolizmasını ve metabolik bozuklukları da inceleyen çalışmalarında yağ dokusu AQP7 ve karaciğer AQP9 ifadelerinin düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulmuşlardır. AQP9 kanalının karaciğerdeki tek gliserol kanalı olduğu düşünülmektedir. (14,74,75). Yapılan çalışmalar daha çok AQP7 ve AQP9'un gen ifadeleri incelenmesi şeklindedir. Prudente ve arkadaşları (76) obezite ve obeziteyle ilişkili

metabolik bozuklukların gliserol kanalı AQP7 geninin A953G polimorfizmlerini incelemiştir. Bilgilerimize göre bu tez çalışmasında ele alınan AQP7 geninin V59L genotip polimorfizmi ile AQP9 geninin T279A ve C43T genotipleri polimorfizmlerinin obez ve T2DM'lu olgularda incelenmesi literatürde bir ilktir. AQP7 geninin promotör bölgelerinde nükleotid değişimi ile saptanan A953G polimorfizmi için AA, AG ve GG genotiplerinin sıklığı Grup 1'de AA 13 (%27,1), AG 28 (%58,3) ve GG 7 (%14,6). Grup 2'de AA 16 (% 28,6), AG 29 (%51,8) ve GG 11 (%19,6). Grup 3'de AA 15 (%28,8), AG 29 (% 55,8) ve GG 8 (%15,4) olarak bulundu. V59L polimorfizmleri bakımından Grup 1 ve Grup 3'ü oluşturan bireylerin tümünde (%100) CC genotipi saptanırken Grup 2'de sadece bir bireyde GC genotipi, ve diğerlerinin tümünde yine CC genotipi saptandı. V59L bakımından katılımcıların hiçbirinde GG genotipi saptanmadı. AQP7 geni için tanımlanan her iki bölgenin polimorfizmlerinin çalışma grupları arasında dağılımları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. İncelenen ikinci gen bölgesi AQP9'a ait T279A ve C43T genotiplerinin polimorfizimlerine bakıldı. T279A ile ilgili en çok GG (%90-95) polimorfizmi bulunurken AG (%5-10) ise çok daha az sıklıkta bulundu. AA polimorfizmi ise üç çalışma grubunun hiçbirinde yani çalışılan toplam 198 bireyin hiçbirinde saptanmadı. C43T bölgesine ait polimorfizmlerde ise çalışılan tüm bireylerde sadece TT genotipi saptanırken TA ve AA genotipleri üç çalışma grubunun da hiçbir bireyinde saptanmadı. Sonuçta çalışma grupları arasında AQP9 T279A ve C43T polimorfizmlerinin dağılımı bakımından anlamlı fark bulunamadı.

Ceperuelo-Mallafre ve ark. (74) aşırı obez kadınlar ile yaptığı çalışmada gliserol plazma düzeyleri ve AQP7 mRNA ifadelerini anlamlı derecede düşük bulunmuş. Fakat dolaşımdaki gliserol ve AQP7 gen ifadesi arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Beslenme sonrası, plazma insülin konsantrasyonu artar. AQP7 ve AQP9 genlerinin düzenleyici bölgelerinde negatif IRE aracılığı ile yağ dokusuna spesifik AQP7 ve karaciğere spesifik AQP9 ifadeleri baskılanır. İlginç bir şekilde, insülin direnci olan obez db/db farelerde hiperinsülinemi olmasına rağmen yağ dokusunda AQP7 ve karaciğerde AQP9 ifadelerinin arttığı gözlenmiştir (8). İnsülin direnci olması durumunda bu akuaporinlerin ifadelerinin artması yağ dokusunda IRS-1 aracılı azalmış insülin sinyali ve hepatositlerde IRS-2 ile uyarılmış insülin sinyalinin azalması neden olabilir (50). AQP7 ifadesinin artması plazma gliserol konsantrasyonunun artmasına neden olur. Dolaşımdaki gliserol konsantrasyonunun artması AQP9 ifadesinin artmasına ve hepatic glukoz üretimine neden olmaktadır (50). Çalışmamızda grupların gösterdiği polimorfizm

özellikleri göz önünde bulundurulmadan kan gliserol ve insülin değerleri karşılaştırıldı. Gliserol düzeyleri Grup 2 (Obez) ve Grup 3 (DM+Obez) de Grup 1 (Kontrol)'e göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Benzer şekilde Grup 1'de normal değerlerde plazma insülin düzeyleri görülürken Grup 2 ve Grup 3'te daha yüksek değerlerde bulundu. Grup 2 ve Grup 3'de gliserol ve insülin değerlerinde ki artışın obeziteye bağlı görülen insülin direncindeki artıştan kaynaklanmış olabileceği düşünüldü. Bu sonuçlar Rodriges ve arkadaşlarının (50) çalışmasını desteklemektedir. Yüksek plazma insülin düzeyleri insülin direncinin varlığı ile beraber AQP7 ve AQP9 ifadelerinin arttığını düşündürmektedir. Mevcut bulgular obezitede ve T2DM hastalığında, yağ dokusuna özgü AQP7 ve karaciğere özgü AQP9 ifadelerinin düzenlenmesinde bozulma olabileceğini düşündürmektedir. Prudente ve ark. (76) tarafından yapılan çalışmada AQP7 geninin promoter bölgesinde A953G tek nükleotid değişim polimorfizmleri saptanmış ve AQP7 promoter bölgesinde A953G genotipinin 977 kafaşyalıda T2DM ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

-953G varyantı taşıyan kişilerin yağ dokularında AQP7'nin daha az ifade olduğu bulunmuştur. Bununla da obezite riskinin özellikle T2DM'lerde arttırdığı gözlenmiştir. BMI XG (AG+GG) lerde AA dişilerden daha yüksek seviyede bulunmuştur (76). Çalışmamızda Plazma insülin değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında Grup 2 ve Grup 3'de Grup 1'e göre anlamlı olarak yüksek bulunmasına rağmen A953G polimorfizmleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark saptanmadı. Ancak sonuçlar dikkatle incelendiğinde obez ve diyabetik olguların bulunduğu Grup 3'de AA, GG ve AG alt gruplarının insülin ortalama değerlerinin birbirinden farklı olduğu AA(homozigot "wild" tip) genotipi en yüksek insülin değerleri görülürken GG (homozigot mutant tip) ve AG (heterozigot) genotiplerinde daha düşük insülin değerleri görüldü. Bu farklılığın alt gruplarda vücut kitle indeksi farklılığından kaynaklanabileceği düşüncesi ile BMI bakımından alt grup karşılaştırmaları yapıldı. Bu karşılaştırmalarda fark saptanmadı. Sonuçta Grup 3'de insülin değerlerindeki farklılığın genotip ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Ancak, bunu test etmek için daha büyük çalışma grubu ile ve farklı metodoloji ile planlama yapmak gereklidir.

Ek olarak, yağ dokusunda AQP7 mRNA içeriğinin ölçümü ve transfekte hücrelerde işleve yönelik çalışmalar, -953G varyantı için biyolojik bir rolü açıkça desteklemektedir. -953G varyantı C/EBP-DNA bağlanmasını azaltarak (böylece AQP7 promoter transkripsiyon aktivitesi bozulur) AQP7 ifadesini negatif yönde düzenlemektedir (11,77)

İnsan AQP7 gen mutasyonları 160 Japon gönüllü de incelenmiştir. Bu popülasyonda; üç çeşit *missense* mutasyon (yanlış anlam mutasyonu) tanımlanmıştır; R12C (a C → T akson 3 teki 206 nükleotidindeki değişim N-terminal sitoplazmik bölgesindeki 12 pozisyonundaki sistin ile argininin değişimine yol açmıştır) 1 kişi. V59L (a G → C akson 4 teki nükleoit 347 deki değişim 1. çift tabaka-genişleme bölgesinde bulunan 59 pozisyonundaki lösin ile valinin değişimine yol açmıştır) 13 kişi. G264V (a G → T ekson 8 deki nükleoit 963 teki değişim 6. Çift tabaka-genişleme alanında bulunan 264 pozisyonundaki valin ile glisinin değişimine yol açmıştır): 6 kişi. Xenopus oksitlerin kullanıldığı fonksiyonel analizler göstermektedir ki, R12C veya V59L mutant proteinler de su ve gliserol geçirgenliği devam etmesine karşın G264V mutant proteininin bulunduğu oositlerinde bozuluma uğramaktadır. G264V mutasyonu altıncı çift tabaka-genişleme alanında bulunmaktadır. Bununla beraber, Japon popülasyonunda G264V'nin homozigot mutasyonu bulunan kişilerde obezite ve diyabet gözlemlenmemiştir (74). Araştırmacılar deneysel olarak oluşturulan AQP7 geni silinmiş (AQP7-KO) fareler geliştirmiş ve analiz etmişlerdir (52,70). Eşit koşullar altında, AQP7-KO fare açlık durumunda WT'den daha düşük plazma ve portal gliserol konsantrasyonları göstermiş. Özellikle yağ dokusunu etkileyen ve lipolizi arttıran β 3-adrenerjik agonist uygulanması; AQP7-KO farelerde bozulmuş plazma gliserol değerleri ile sonuçlanırken hem "wild" tip de hem de AQP7-KO farelerde plazma serbest yağ asidi değerleri normal bulunmuş. Erken yaşlarda "wild" tip ile AQP7-KO farelerin vücut ağırlığı arasında bir fark yok iken 12 haftalık olduklarında AQP7-KO fareler obez olmaya başladıkları görülmüş (4,77). Buna ek olarak, AQP7-KO fareler de obezite ile ilişkili olarak insülin direnci görülmüştür (48).

Diğer yandan, lipoliz esnasında yağ dokusunda TG'in hidrolizi ile açığa çıkan gliserol direkt olarak portal ven ile karaciğere AQP9 yoluyla alınır ve glikoneojenez substratı olarak kullanılır. AQP9 ifadesinin karaciğerdeki tek gliserol kanalı olduğu düşünülmektedir ve glukoz homeostazında önemli bir role sahiptir (14,70,78). AQP9 mRNA seviyesi açlık durumunda artar ve besin alımı ile azalır (51). Besin alımı sonrası tokluk durumunda, insülin varlığı AQP9 ifadesini baskımlarken insülin direnci varlığında, hiperinsülinemiye rağmen AQP9 ifadeleri çok fazla artar. Bu da hepatik glukoneogenez için gliserol tüketiminde artışına neden olur.

Catalan ve arkadaşlarının (12) yaptığı çalışmada obez diyabetik (OB T2DM) hastaların karaciğerinden elde edilen AQP9 mRNA ifadeleri obez normoglisemik (OB NG) ve obez bozulmuş glukoz toleransı olan (OB IGT) kişilerin mRNA ifadeleri ile

karşılaştırılmış. OB T2DM'lu olgularda karaciğere spesifik AQP9 ifadelerinde anlamlı düzeyde azalma görülmüş. Bu azalma, hipergliseminin daha da artmasına izin vermemek için hepatik glukoz üretimini durdurmak amacıyla karaciğere gliserol girişinin azaltılması ile açıklanabilir. Bu bulgular, obezite ve T2DM'da sırasıyla yağ dokusunda gliserol salınımı kolaylaştıran ve hepatositlere gliserol girişini azaltan düzenleme mekanizmalarının varlığını yansıtır olabilir (12,79-81).

Son zamanlarda, AQP9 geni silinmiş (AQP-KO) fareler geliştirilmiş ve analiz edilmiştir (46,72). AQP9^{-/-} fare AQP9^{+/-} kıyaslandığında plazma gliserol ve trigliserit seviyelerinde önemli derecede artış göstermiş. AQP9^{-/-} fareler obez ve T2DM türündeki (Lepr^{db}, obezite ve T2DM'a neden olan leptin reseptör mutasyonu ile leptin fonksiyon eksikliği) Lepr^{db}/Lepr^{db} fareleriyle çaprazlamışlar. Lepr^{db}/Lepr^{db} AQP9^{-/-} farelerinin kan glukoz seviyeleri, 3 saat açlık sonrasında Lepr^{db}/Lepr^{db} AQP9^{+/-} farelerinden daha düşük bulunmuş. Bu da AQP9 gen ifadesinin hepatik gliserol ve glukoz metabolizmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir (72,82-84).

Bu tez çalışmasının bütçesinin sınırlı, kullanılan problemlerin ve kitlerin maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle Grup 1'de 49, Grup 2'de 60, Grup 3'te 89 kişi ile çalışılabilmektedir. Elde edilen sonuçlar AQP7 geninin A953G ve V59L gen polimorfizmleri ile AQP9 geninin T279A ve C43T polimorfizmlerinin obez, obez+diyabetik ve non-obez+non-diyabetik gruplarda farklı dağılıma sahip olmadığı bulunmuştur. Bundan sonraki planlayacağımız çalışmalar, farklı polimorfizimleri de içeren fazla sayıda kişide ve mekanizmayı açıklamaya yönelik olacaktır. Bu sayede AQP7 ve AQP9 su kanallarındaki polimorfizm farklılıklarının obezite ve DM hastalıklarının gelişimine katkısını açıklayabileceğimize inanmaktayız.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilen, obez ve diyabetik hastalarda AQP7 geninin A953G ve V59L genotipleri ile AQP9 geninin T279A ve C43T genotiplerinin polimorfizmlerinin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen veriler ışığında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

1. Çalışma gruplarının yaş ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık gösterdi. Kontrol grubu en genç grubu oluştururken hem diyabet hem de obez grup daha yaşlı çalışma grubuydu. Üç grupta kan glukoz ortalamaları beklendiği şekilde anlamlı düzeyde birbirinden farklı bulundu. Grup 1 ve 2’de kan glukoz düzeyleri normal sınırlarda bulunurken Grup 3’te kan glukoz düzeyi normalin üzerindeydi. Benzer şekilde Grup 1 normal kilolu bireyleri, Grup 2 ve Grup 3 obez hastaları içerdiği için BMI ortalamaları da anlamlı düzeyde birbirinden farklı bulundu. Grupların gösterdiği polimorfizm özellikleri göz önünde bulundurulmadan yapılan karşılaştırmada plazma gliserol ve insülin düzeylerinde de anlamlı derecede fark saptandı. İstatistik analiz sonuçlarına göre en düşük gliserol ve insülin düzeyleri sağlıklı kontrol grubunda görülürken Grup 2 ve Grup 3’te daha yüksekti. Bu farklılığın obeziteye bağlı görülen insülin direncindeki artıştan kaynaklanmış olabileceği düşünüldü. Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) düzeyleri ise gruplar arasında benzer özellikler gösterdi.

2. Çalışmanın ana eksenini oluşturan AQP7 ve AQP9 kanalları su yanısıra gliserol geçişine de izin vermektedir. Yağ dokusunda ifade edilerek dokudan gliserol çıkışını sağlayan AQP7’nin A953G ve V59L iki gen bölgesine ait polimorfizmler incelendi. AQP7 “Promoter” bölgelerinde nükleotid değişimi ile saptanan A953G polimorfizmi sonuçlarına bakıldığında grupları oluşturan bireylerin %50-60’ında AG genotipi görülürken, ikinci

sıklıkta AA (yaklaşık %25-30) ve üçüncü sıklıkta GG (yaklaşık %15) genotipi görüldü. Gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı. AQP7'nin A953G gen polimorfizmleri gruplar arasında plazma gliserol ve insülin değerleri yönünden karşılaştırıldı. Plazma gliserol değerleri çalışma grupları arasında karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı bulunmasına rağmen, bu karşılaştırma A953G polimorfizmleri temel alınarak farklı genotipler arasında yapıldığında istatistiksel bakımdan anlamlı fark saptanmadı. Bu sonuç AQP7 kanalını kodlayan A953G gen bölgesinin farklı genotiplerinin varlığının kanalın gliserol taşıma işlevinde bir farklılığa yol açmadığını ve dolayısıyla gliserol düzeylerini etkilemediğini düşündürmektedir. Aynı şekilde Plazma insülin değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında Grup 2 ve Grup 3'de Grup 1'e göre anlamlı olarak yüksek bulunmasına rağmen A953G polimorfizmleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark saptanmadı. Veriler dikkatle incelendiğinde Grup 3'de AA, GG ve AG genotiplerinin insülin ortalama değerlerinin birbirinden farklı olduğu AA(homozigot "wild" tip) genotipi en yüksek insülin değerleri gözükürken GG (homozigot mutant tip) ve AG (heterozigot) genotiplerinde daha düşük insülin değerleri görüldü. Bu farklılığın alt gruplarda vücut kitle indeksi farklılığından kaynaklanabileceği düşüncesi ile BMI bakımından alt grup karşılaştırmaları yapıldı. Bu karşılaştırmalarda fark saptanmadı.

3. AQP7 geninde çalışılan 2. genotipleme V59L polimorfizmleri bakımından Grup 1 ve Grup 3'ü oluşturan bireylerin tümünde (%100) CC genotipi saptanırken Grup 2'de sadece bir bireyde GC genotipi, ve diğerlerinin tümünde yine CC genotipi saptandı. V59L bakımından katılımcıların hiçbirinde GG genotipi saptanmadı. Gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı.

4. AQP9 geninin T279A ve C43T genotiplerinin polimorfizmleri incelendi. T279A polimorfizmi açısından bakıldığında her üç grupta da olguların büyük çoğunluğu GG (%90-95) genotipini gösterdi. GA(%5-10) genotipi daha az sayıda görüldü. AA genotiplemesi ise üç çalışma grubunun hiçbirinde yani çalışılan toplam 198 bireyin hiçbirinde saptanmadı. AQP9 geninin T279A polimorfizmleri gruplar arasında plazma gliserol ve insülin değerleri yönünden karşılaştırıldı. Plazma gliserol ve insülin değerleri gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunmasına rağmen T279A polimorfizmleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

5. C43T polimorfizmi bakımından ise çalışılan tüm bireylerin TT genotipi gösterdiği görüldü. Bu durum çalışma gruplarına dahil edilen birey sayısının nispeten küçük olmasından kaynaklanabilir.

Bu sonuçlar AQP7 geninin A953G ve V59L genotiplerine ait polimorfizmleri ile AQP9 geninin T279A ve C43T genotiplerine ait polimorfizmlerinin mevcut olgularda obezite ve T2DM varlığı ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir.

ÖZET

Yağ dokusu ve karaciğer arasında gliserol taşınmasında meydana gelecek değişiklikler T2DM ve/veya obezite gelişiminde önemli rol oynayabilir. Bu çalışmada, yağ dokusundan gliserol çıkışı sağlayan AQP7 ile karaciğere gliserol girişini sağlayan AQP9 kanallarının polimorfizmleri araştırılmıştır. Etik onay alındıktan sonra çalışma hakkında bilgi verilerek gönüllü olur formunu imzalayanlardan üç grup oluşturuldu: GRUP 1, diyabeti olmayan ve normal kilolu bireyler (n=49; E/K, 18/31; ortalama yaş, 36±10 yıl), GRUP 2, diyabeti olmayan obez bireyler (n=60; E/K, 29/31; ortalama yaş, 47±10 yıl) ve GRUP 3, T2DM tanısı almış ve aynı zamanda obezitesi olan bireylerden (n=89, E/K, 33/56; ortalama yaş, 53±8 yıl) oluştu. Alınan venöz kan örneklerinde insülin, gliserol, kan lipid profili ölçümlerine ek olarak gerçek zamanlı PCR ile AQP7 için 2 bölge (V59L “rs:4008659” ve A953G “rs:2989924”) ve AQP9 için 2 bölge (C43T “rs:77284866” ve T279A “rs:1867380”) genotiplerinin polimorfizmleri çalışıldı. AQP7 ve AQP9 polimorfizmlerinin dağılımları bakımından çalışma grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. İstatistiksel analiz sonucunda üç grupta insülin ve gliserol düzeyleri anlamlı derecede farklı bulundu (GRUP 1, 2 ve 3 için sırasıyla ortalama±SE olarak insülin değerleri 7,21±0,94; 13,71±2,20 ve 18,21±2,32; p<0,001; gliserol değerleri 0,68±0,04; 0,79±0,05 ve 0,97±0,05; p<0,001). Plazma gliserol ve insülin değerleri A953G ve T276A polimorfizmleri temel alınarak farklı genotipler arasında yapıldığında istatistiksel bakımdan anlamlı fark saptanmadı. Bu sonuçlar, AQP7 ve AQP9 su/gliserol kanallarındaki çalışmada tanımlanan farklı polimorfizmlerin T2DM ve/veya obez olan hastalarda kontrol grubuna kıyasla dağılımlarının farklı olmadığını göstermiş ve AQP7 ve

AQP9 kanallarındaki bu polimorfizmlerin T2DM ve obezite fizyopatolojisinde rol oynamadığını düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Aquaporinler, diabetes mellitus, obezite, polimorfizm, polimeraz zincir reaksiyonu.

GENE POLYMORPHISMS OF WATER AND GLYCEROL CHANNELS AQUAPORIN 7 AND 9 IN OBESE AND/OR DIABETIC PATIENTS

SUMMARY

The changes that may occur during glycerol transport between adipose tissue and liver can play an important role in the development of diabetes or obesity. In this study, the polymorphisms of AQP7 that provides glycerol release from adipose tissue and AQP9 that provides glycerol entry into liver were investigated. After ethical approval, as giving the information about the study, three groups are created by people who signed the informed consent form. Group 1; the individuals that have no diabetes and that have normal weight (n=49; E/K, 18/31; average age, 36±10 year), Group 2, the individuals who have no diabetes but obesity (n=60; E/K, 29/31; average age, 47±10 year) and Group 3, the individuals who diagnosed T2DM and at the same time have obesity (n=89, E/K, 33/56; average age, 53±8 year). At the venous blood samples insulin, glycerol, blood lipid levels were measured. Polymorphisms of AQP7 in 2 locations (V59L “rs: 4008659” and A953G “rs:2989924”) and AQP9 in 2 locations (C43T “rs:77284866” and T279A“ rs:1867380”) were studied. Polymorphisms of AQP7 and AQP9 were similar in study groups. At the end of the statistical analysis among 3 groups, levels of insulin and glycerol are found significantly different (Group 1,2,3 mean insulin values as±SE, 7,21±0,94; 13,71±2,20 and 18,21±2,32; p<0,001; glycerol values 0,68±0,04; 0,79±0,05 and 0,97±0,05; p<0,001). Considering the polymorphisms of A953G and T276A, plasma glycerol and insulin levels

were similar in different genotypes. These results suggest that polymorphisms of AQP7 and AQP9 were not associated with pathophysiology of obesity or diabetes.

Key Words: Aquaporins, diabetes mellitus, obesity, polymorphism, polymerase chain reaction.

KAYNAKLAR

1. Francesco Branca(Ed), Haik Nikogosian and Tim Lobstein. The challenge of obesity in the WHO European Region and the strategies for response. WHO Denmark 2007.
2. World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Technical Report Series No: 894 WHO Geneva 2000.
3. World Health Organization. Obesity and Overweight Fact Sheet.WHO 2008;3110-17.
4. Hibuse T, Maeda N, Nagasawa A, Funahashi T. Aquaporins and glycerol metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:1004-1011.
5. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas.3rd Edition, Brussels, 2006.
6. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas, 4th Edition, Brussels, 2009.
7. Agre P, Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett* 2003;555:72-78.
8. Kuriyama H, Shimomura I, Kishida K, Kondo H, Furuyama N, Nishizawa H, et al. Coordinated Regulation of Fat-Specific and Liver-Specific Glycerol Channels, Aquaporin Adipose and Aquaporin 9.*Diabetes* 2002;51:2915-21.
9. Kishida K, Kuriyama H, Funahashi T, Shimomura I, Kihara S, Ouchi N, et al. Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J Biol Chem* 2000;275:20896-902.
10. Miranda M, Ceperuelo-Mallafréa V, Lecubeb A, Hernandez C, Chacona MR, et al. Gene Expression Of Paired Abdominal Adipose AQP7 And Liver AQP9 In Patients With Morbid Obesity Relationship With Glucose Abnormalities. *Metabolism* 2009;1-7.

11. Kondo H, Shimomura I, Kishida K, Kuriyama H, Makino Y, Nishizawa H. Human aquaporin adipose (AQPap) gene genomic structure, promoter analysis and functional mutation. *Eur J Biochem* 2002;269:1814-1826.
12. Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Pastor C. Influence of morbid obesity and insulin resistance on gene expression levels of AQP7 in visceral adipose tissue and AQP9 in liver. *Obes Surg* 2008;18:695–701.
13. Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y. Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;244:268–274.
14. Elkjaer M, Vajda Z, Nejsum LN, Kwon T, Jensen UB, Amiry-Moghaddam M, et al. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276:1118–1128.
15. Gürdöl F, Ademoğlu E. *Biyokimya. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2010:238-41.*
16. Betacell Biology Consortium 2004
http://www.betacell.org/content/briefview/brief_id/40.
17. Guyton AC. *Tıbbi Fizyoloji (çeviri: H. Çavuşoğlu, B. Çağlayan Yeğen). 11.basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2006;968-70.*
18. Thong F, Dugani C, Klip A. Turning Signals On and Off: GLUT4 Traffic in the Insulin-Signaling Highway. *Physiology* 2005;20:271-84.
19. Yiğit G. *Hemotoloji ve Endokrin Fizyolojisi. İstanbul:Nobel Tıp Kitapevleri 2011;163-72.*
20. Moran LA, Agarwal JP, Hopkins PN. *Mendenhall Principles of Biochemistry. 5th ed. Rawn,USA: Pearson 2012:355-85.*
21. Michael M, Engelgau KM, Venkat N, William HH. Screening for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2000;23(10):1563-80.
22. Afshin FF, Davies JD, Braam LA, Henri M, Proudfoot SD. A polymorphism of the human matrix carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels. *JBC* 2001;276(35):32466-32473.
23. O'Donnell CJ, Shea MK, Price PA, Gagnon DR, Wilson PWF, et al. Matrix gla protein is associated with risk factors for atherosclerosis but not with coronary artery calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(12):2769–2774.
24. Crosier MD, Booth SL, Peter İ, Dawson-Hughes B, Price PA, O'Donnell CJ, et al. Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification in men. *J Nutr Sci Vitaminol* 2009;55(1):59-65.

25. ADA Clinical Practice Recommendations. Standards of medical care. Diabetes Care 2009;32:13-61.
26. Türkiye Diyabet Önleme Ve Kontrol Programı 2011-2014. T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Ankara;2011 yayın no 816:1-9.
27. Satman İ, TURDEP Çalışma Grubu. TURDEP-II Çalışması ilk sonuçlar, 32.TEMH Kongresi, Antalya, 2010.
28. Global Database on BMI, WHO 2008. <http://www.who.int/bmi/index.3html>.
29. Molarius A, Seidel JC, Sans S, Toumlehto J, Kuulasmaa K. Varying sensitivity of waist action levelsto identify subjects with overweight or obesity in 19 populations of the WHO MONICA Project. J Clin Epidemiol 1999;52:1213-24.
30. Akbulut G, Özmen M, Besler T. Çağın Hastalığı Obezite, TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi 2007;2-15.
31. Şakar Ş. Obezitenin Tıbbi Beslenme Tedavisi, Obezite Dergisi 2006;6(9):15-17.
32. "Sağlık Beslenelim, Kalbimizi Koruyalım" Projesi Araştırma Raporu, Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Ankara, 2004.
33. Tüzün M. Obezite Tanım, Sıklık, Tanı, Sınıflandırma, Tipleri, Dereceleri ve Komplikasyonları.(Ed. Yılmaz C).İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 1995;1-20.
34. Yıldırım M, Akyol A, Ersoy G. Şişmanlık (Obezite) ve Fiziksel Aktivite (Koord. Besler T ve Rakıcioğlu N, (Ed) Coşkun A, Kesici C, Çelikcan E, Bilici S.) Hastalıklarda Beslenme ve Obezite Bilgi Serisi Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Ankara 2008;235-244.
35. WHO. Global Strategy On Diet, Physical Activity and Health. Geneva, WHO 2003.
36. Pekcan G. Türkiye'de beslenme sorunları ve boyutları: Besin ve beslenme politikalarının önemi. Yeni Türkiye Sağlık Özel Sayısı I 2001;39:572-585.
37. Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. J Physiol 2002;542-3.
38. Agre P. Nobel Lecture. Aquaporin water channels. Biosci Rep. 2004;24(3):127-63.
39. Smith BL, Agre P, Erythrocyte Mr. 28000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to change proteins. Biol Chem 1991;266(10):6407-15.
40. Eric Beitz (Ed) Aquaporins. Handb Exp Pharmacol 2009;(5)190:19-20.
41. Fushimi K, Uchida S, Hara Y. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. Nature 1993;361 549-552.

42. Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. Aquaporins: a family water channel proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 1993;265:461.
43. Bondy C, Chin E, Smith BL, Preston GM, Agre P. Developmental gene expression and tissue distribution of the CHIP28 water-channel protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(10):4500-4.
44. Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot BL, Philippsen A, Agre P, et al. Structure and function of water channels. *Curr Opin Struct Biol* 2002; 12(4):509-15.
45. Fu D, Lu M. The structural basis of water permeation and proton exclusion in aquaporins. *Mol Membr Biol* 2007;24:366-74.
46. Sui H, Han BG, Lee J K, Walian P. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 2001;414:872–78.
47. Skowronski MT, Lebeck J, Rojek A, Praetorius J, Füchtbauer EM, et al. AQP7 is localized in capillaries of adipose tissue, cardiac and striated muscle: implications in glycerol metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292(3):956–65.
48. Frühbeck G, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A. Aquaporin-7 and glycerol permeability as novel obesity drug-target pathways. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:345-7.
49. Hara-Chikuma M, Verkman AS. Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1386-92.
50. Frühbeck G. Obesity: aquaporin enters the picture. *Nature* 2005; 438: 436-7.
51. Rodriguez A, Catalana V, Gomez-Ambrosia J, Fruhbeck G. Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice. *FEBS Lett* 2006;580 4771–76.
52. Kuriyama H, Shimomura I, Kishida K, Kondo H, Furuyama N, Nishizawa H. Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes* 2002;51:2915-21.
53. Maeda N, Hibuse T, Funahashi T. Role of Aquaporin-7 and Aquaporin-9 in Glycerol Metabolism; Involvement in Obesity. *Aquaporins. Handb Exp Pharmacol* 2009;190,234-46.
54. Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, et al. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem* 2003;278, 30413–30416.
55. Hanson RW, Ballard FJ, Reshef L. Glyceroneogenesis, the pathway that almost wasn't. *Biochem Mol Biol Educ* 2006;34(5):317-23.
56. MacDougald OA, Burant CF. Obesity and metabolic perturbations after loss of aquaporin 7, the adipose glycerol transporter. *PNAS* 2005;102(31):10759-10760.

57. Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Frühbeck G. Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control. *Cell Cycle* 2011;10(10):1548-56.
58. Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. ISBN 2004;73-111.
59. Reuter M, Küpper Y, Schmitz A, Breuer J .P, Wend U, et al. Detection of new single nucleotide polymorphisms by means of real time PCR. *J Genet* 2005;84:3.
60. Lohmann S, Lehmann L, Tabiti K. Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System, *Biochemica* 2000;4:23-28.
61. Durmaz R, Gunal S, Yang Z, Ozerol IH, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Press in CMI* 2003; 9.
62. Kishida K, Shimomura I, Nishizawa H, Maeda N, Kuriyama H, Kondo H, et al. Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 2001;276(51):48572–79.
63. Hibuse T, Maeda N, Nakatsuji H, Tochino Y, Fujita K, Kihara S. The heart requires glycerol as an energy substrate through aquaporin 7, a glycerol facilitator. *Cardiovasc Res* 2009;83:34-41.
64. Sjöholm K, Palming J, Olofsson LE, Gummesson A, Per-Arne Svensson P, et al. A microarray search for genes predominantly expressed in human omental adipocytes: adipose tissue as a major production site of serum amyloid. *A. J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(4):2233-39.
65. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106(4):473-81.
66. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001;104(4):531-43.
67. Friedman SL. 139.Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004;1(2):98-105.
68. Maeda N, Funahashi T, Shimomura I. Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4(11):627-34.
69. Maeda N. Implications of aquaglyceroporins 7 and 9 in glycerol metabolism and metabolic syndrome. *Mol Aspects Med* 2012:4-11.
70. Miranda M, Escote X , Ceperuelo-Mallafre´ V, Alcaide MJ, Vilarrasa SN, Wabitsch M, Vendrell J. Paired subcutaneous and visceral adipose tissue aquaporin-7 expression in human obesity and type 2 diabetes: differences and similarities between depots. *Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(7):3470-3479.

71. Maeda N, Funahashi T, Hibuse T, Nagasawa A, Kishida K, Kuriyama H, et al. Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue. *PNAS* 2004;101(51):17801–806.
72. Marrades MP, Milagro FI, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. Differential expression of aquaporin 7 in adipose tissue of lean and obese high fat consumers. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:785–789.
73. Rojek AM, Skowronski MT, Fuchtbauer EM, Fuchtbauer AC, Fenton RA, Agre P et al. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci*, 2007;104:3609–14.
74. Liu Y, Promeneur D, Rojek A, Kuma N, Agre P. Aquaporin 9 is the major pathway for glycerol uptake by mouse erythrocytes, with implications for malarial virulence. *PNAS* 2007;104(30):12560–12564.
75. Ceperuelo-Mallafre V, Miranda M, Chacon MR. Adipose tissue expression of the glycerol channel aquaporin-7 gene is altered in severe obesity but not in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3640-3645.
76. Ohgusu Y, Ohta K, Ishii M, Katano T, Urano K, Watanabe J. Functional characterization of human aquaporin 9 as a facilitative glycerol carrier. *Drug Metab Pharmacokinet* 2008;23(4):279–284.
77. Prudente S, Flex E, Morini E, Morini E, Turchi F. A functional variant of the adipocyte glycerol channel aquaporin 7 gene is associated with Obesity and related metabolic abnormalities. *Diabetes* 2007;56:1468–74.
78. Rai T, Ikawa M, Okabe M, Sasaki S, Uchida S, Verkman AS. Progressive Adipocyte Hypertrophy in Aquaporin-7-deficient Mice. *J Biol Chem*. 2005; 280:(16)15493–96.
79. Carbrey JM, Gorelick-Feldman DA, Kozono D, Praetorius J, Agre P. Aquaglyceroporin AQP9: Solute permeation and metabolic control of expression in liver. *PNAS* 2003;10(5):2945–2950.
80. Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Diez-Caballero A, Martinez-Cruz LA, Gil MJ. Gene expression profile of omental adipose tissue in human obesity. *FASEB J* 2004;18(1):215-7.
81. Agre P. The Aquaporin Water Channels. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:5-13.
82. Christian M, Kiskinis E, Debevec D. RIP140-Targeted repression of gene expression in adipocytes. *Mol Cell Bio* 2005;25:9383–9391.
83. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. *MedStar Physician Partners/MedStar Family Choice* 2007:1-2.
84. Engel A, Fujiyoshi Y, Gonen T and Walz T. Junction-forming aquaporins. *Curr Opin Struct Biol*. 2008;18:229–235.

ŞEKİLLER VE TABLOLAR

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	İnsülin sentezi (16)	5
Şekil 2.	Kan glukoz düzeyinde normal sınırın 2-3 katına çıkan ani bir artış sonrası plazma insülin konsantrasyonunda gözlenen artış (17).....	6
Şekil 3.	Pankreastan insülin salgılanmasının mekanizması (17)	8
Şekil 4.	İnsülin reseptörünün şematik görünümü (17).....	9
Şekil 5.	GLUT4 trafiğini düzenlemede insülin tarafından aktive edilen ya da baskılanan anahtar moleküler sinyaller (18).....	10
Şekil 6.	Glukoz kullanım evreleri (20)	13
Şekil 7.	Akuaporin ifade eden ve ifade etmeyen hücrelerle Peter Agre tarafından yapılan deney. Akuaporinler hücrenin su emilimi ile şişmesi için gereklidir (39).....	20
Şekil 8.	İnsan akuaporin gen ailesi (7).....	21
Şekil 9.	Akuaporin kanal yapısı. 2 ayrı tekrardan oluşan 6 transmembran heliks (7) ...	23
Şekil 10.	Akuaporin1 kanalından su geçişinin fonksiyonel şeması. (64)	24
Şekil 11.	Proton dışlama mekanizması (39)	25
Şekil 12.	Adiposit oluşumu ve işlevinde AQP7'nin rolü (50).....	26
Şekil 13.	Yağ dokusunda lipogenez ve lipolizin düzenlenmesi (4).....	26

Şekil 14. Yağ dokusunda Akuaporin 7 ve karaciğerde Akuaporin 9'un açlık ve beslenme durumunda düzenlenmesi (52)	27
Şekil 15. Akuaporin 7 ve Akuaporin 9'un glukoz homeostazındaki fonksiyonu (56)	28
Şekil 16. <i>LightCycler2.0</i> Cihazı.....	31
Şekil 17. Bu hibridizasyon problemlerinden sensör prob 3'ucundan <i>Fluoresein</i> (donör boya) ile anchor prob ise 5'ucundan LC Red 640 (alıcı boya) ile işaretlenmiştir. Denatürasyon basamağında hibridizasyon problemleri solüsyon içerisinde ayrı ayrı durmaktadırlar.	32
Şekil 18. <i>Annealing</i> basamağında, problemler hedef DNA dizisine yan yana bağlanır. Birinci boyanın emisyon enerjisi ikinci boyayı eksite eder. Eksite olan ikinci boya da emisyon enerjisi yayar.	33
Şekil 19. <i>Annealing</i> basamağından sonra gerçekleşen " <i>elongation</i> " (uzama) basamağının başlamasıyla sıcaklık artışı gerçekleşmekte ve sıcaklık artışıyla hibridizasyon problemleri hedef DNA dizisinden ayrılmaya başlamaktadır.	33
Şekil 20. Uzama basamağının ardından çift iplikli ampliconların oluşmasıyla hibridizasyon problemleri serbest hale gelmekte ve birbirlerinden uzakta bulunmaktadır.	34
Şekil 21. Gliserol standart grafiği.	42
Şekil 22. AQP7 geninin (A953G) genotip örneğinin erime eğrisi (melting curve) ve erime pikleri (melting peak) analiz sonucu. Şekilde hastanın örnekleri (kırmızı ve yeşil eğriler) ile bir negatif kontrol (mavi eğri) gösterilmiştir. Yeşil eğri ile gösterilen örnekte hem G hem de A allelinin varlığını gösteren (AG heterozigot) 2 adet pik (PİK 1 ve PİK 2) elde edilirken, kırmızı eğride sadece A allelinin varlığını gösteren 1 adet pik (PİK 2) görüldü.	49
Şekil 23. AQP7 geninin (A953G) genotip örneğinin erime eğrisi (melting curve) ve erime pik (melting peak) analiz sonucu. Şekilde hastanın örnekleri (kırmızı ve yeşil eğriler) ile bir negatif kontrol (mavi eğri) gösterilmiştir. Kırmızı eğride sadece G allelinin varlığını gösteren 1 adet pik (PİK 1) görülürken, Yeşil eğri ile gösterilen örnekte hem G hem de A allelinin varlığını gösteren (AG heterozigot) 2 adet pik (PİK 1 ve PİK 2) elde edilmiştir.	49

- Şekil 24.** AQP7 geninin (A953G) genotipinin erime pikleri analiz sonucu. Allel G (PİK1), Allel A (PİK2) ve heterozigot AG (PİK1ve PİK2) 50
- Şekil 25.** AQP7 A953G polimorfizm gruplarına göre gliserol düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Grup içi karşılaştırmalarda Grup 1 $p > 0,358$, Grup 2 $p > 0,255$, Grup 3 $p > 0,743$ 51
- Şekil 26.** AQP7 A953G polimorfizm gruplarına göre insülin düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Grup içi karşılaştırmalarda Grup 1 $p > 0,716$, Grup 2 $p > 0,386$, Grup 3 $p > 0,129$ 51
- Şekil 27.** AQP7 geninin (V59L) genotiplemesinin erime sıcaklığı (melting curve) ve erime pikleri (melting peak) analiz sonucu. Şekilde hastanın örnekleri (kırmızı ve yeşil eğriler) ile bir negatif kontrol (mavi eğri) gösterilmiştir. Yeşil eğri ile gösterilen örnekte hem G hem de C allelinin varlığını gösteren (GC heterozigot) 2 adet pik (PİK 1 ve PİK 2) elde edilirken, kırmızı eğride sadece C allelinin varlığını gösteren 1 adet pik (PİK 2) görüldü. 52
- Şekil 28.** AQP9 geninin (T279A) genotiplemesinin eğrime pik (melting peak) analiz sonucu.Şekilde hastanın örnekleri (mavi ve açık yeşil eğriler) ile bir negatif kontrol (mor eğri) gösterilmiştir. Açık yeşil eğri ile gösterilen örnekte hem A hem de G allelinin varlığını gösteren (AG heterozigot) 2 adet pik (PİK 1 ve PİK 2) elde edilirken, mavi eğride sadece G allelinin varlığını gösteren 1 adet pik (PİK 2) görüldü. 54
- Şekil 29.** AQP9 T279A polimorfizm gruplarına göre gliserol düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Grup içi karşılaştırmalarda Grup 1 $p > 0,054$, Grup 2 $p > 0,795$, Grup 3 $p > 0,354$ 55
- Şekil 30.** AQP9 T279A polimorfizm gruplarına göre insülin düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Grup içi karşılaştırmalarda Grup 1 $p > 0,339$, Grup 2 $p > 0,099$, Grup 3 $p > 0,517$ 56

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.	Farklı dokularda yerleşmiş glukoz taşıyıcı proteinler (6).....	7
Tablo 2.	2010 yılında dünyada diyabet ve bozulmuş glukoz toleransı ve 2030 yılı için beklenen artış (20-79 yaş grubu) (6,27).....	8
Tablo 3.	Dünya Sağlık Örgütü Diyabet Projeksiyonu 2000–2030(6,27).....	17
Tablo 4.	Yetişkinlerde BKİ'ye göre zayıflık, fazla kiloluluk ve obezite sınıflandırması (28)	18
Tablo 5.	Akuaporinleri kodlayan kromozom bölgeleri, su ve gliserol geçirgenlikleri ile buldukları dokular (42).....	22
Tablo 6.	DNA izolasyon kit içeriği (Roche Diagnostik-Almanya)	39
Tablo 7.	Gliserol kit içeriği (<i>Biovision</i>)	41
Tablo 8.	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) Protokolü ..	43
Tablo 9.	Denatürasyon Programı	43
Tablo 10.	Amplifikasyon Programı	44
Tablo 11.	Soğutma Programı	44
Tablo 12.	Çalışma gruplarının demografik, antropometrik ve biyokimyasal özellikleri..	47
Tablo 13.	Çalışma gruplarında farklı AQP7 polimorfizmlerinin dağılımları	48
Tablo 14.	AQP7 izlenen A953 genotipleme, Tm ve Pik sayıları	48
Tablo 15.	AQP7 izlenen V59L genotipleme, Tm ve Pik sayıları	52
Tablo 16.	Çalışma gruplarında farklı AQP9 polimorfizmlerinin dağılımları	53
Tablo 17.	AQP7 izlenen T279A genotipleme, Tm ve Pik sayıları.....	54
Tablo 18.	AQP9 geninin VC43T genotipleme, Tm ve Pik sayıları	55

ÖZGEÇMİŞ

Ad:	Orkide
Soyad:	PALABIYIK
Doğum Yeri:	Edirne
Doğum Tarihi:	17.08.1969
Görev Yeri:	Biyofizik A.D.
Yabancı Dil:	İngilizce
E-Posta Adresi	Orkide_69@hotmail.com

Tarih	Eğitim
1992	Lisans: Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi-Kimya
2003	Yüksek Lisans: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.D.
2007	Doktora-devam ediyor Tarakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D.

YAYIN LİSTESİ

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

A1. Sipahi, T., A. A. Basak, Z. Ozgen, A. Aksoy, I. K. Omurlu, O. Palabiyik, S. Cakina ve S. Sener, "Lack of evidence for contribution of endothelial nitric oxide synthase intron 4 VNTR gene polymorphisms to development of ischemic stroke in turkish subjects", *Biotechnol and Biotechnol Eq*, **23**, 1372-1377, (2009).

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:

B1. Sipahi, T., B. Guldiken, O. Palabiyik, S. Güldiken, T. K. Okman, S. Üstündağ ve N. Turgut, "Lack of Association of ACE I/D Gene Polymorphism with Migraine Disease In Turkish Subjects of Trakya Region", *2nd International Biophysics Congress and Biotechnology at GAP & 21st National Biophysics Congress*, Diyarbakır, Bildiri Özetleri CD (P-69), p:100-101, 2009.

B2. Palabiyik, O., T. Sipahi, S. Ustundag, Z. Ozgen, M. Budak ve S. Sener, "The Relationship of Angiotensin II Type 1 Receptor Gene Polymorphism and Hypertension in Patients in Trakya Region", *2nd International Biophysics Congress and Biotechnology at GAP & 21st National Biophysics Congress*, Diyarbakır, Bildiri Özetleri CD (P-78), p:105, 2009

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

E1. Palabiyik, O., T. Sipahi ve S. Şener, "Farklı türde kanserli hastalarda melatonin ritmi ve G protein mutasyonları", *XV. Ulusal Biyofizik Kongresi*, Denizli, Bildiri Özetleri Kitabı, sf: 94, 2003.

E2. Başak, A. A., T. Sipahi, S. Üstündağ, A. Aksoy, Z. Özgen, O. Palabiyik, S. Şen ve S. Şener, "Endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz Gen Polimorfiziminin Hipertansiyon ile İlişkisi", *XX. Ulusal Biyofizik Kongresi*, Mersin, Bildiri Özetleri Kitabı, sf: 24-25, 2008.

E3. Tammam SİPAHİ, Babürhan GÜLDİKEN, Orkide PALABIYIK, Sibel GÜLDİKEN, Hülya ÖZKAN, Levent KABAYEL, Nilda TURGUT, Remziye HÜNKAR, Seralp ŞENER, "Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz 4 a/b Gen Polimorfizminin Migren İle İlişkisi", *22. Ulusal Biyofizik Kongresi, Aydın, Bildiri Özetleri Kitabı, sf:41-42, 2010*

E4. Orkide PALABIYIK, Tammam SİPAHİ, Ferda ÖZDEMİR, Derya DEMİRBAĞ KABAYEL, Seralp ŞENER, "Osteoporoz ve Osteoporozla Bağlı Kırıkların Osteoprotegerin Gen Polimorfizmi ile İlişkisi", *22. Ulusal Biyofizik Kongresi, Aydın, Bildiri Özetleri Kitabı, sf:52-53, 2010.*

E5.Selma Arzu VARDAR, Orkide PALABIYIK, Ruhan TOPUZ, Elif Ezgi GÜREL, Selma ÇALIŞKAN, Serap TOPÇU, Hakan KARADAĞ " Kısa dönem egzersizin reperfüzyon hasarına bağlı hemodinamik yanıtlara etkisinde atrial natriüretik peptidin rolü.3.Egzersiz Fizyolojisi Sempozyumu.2011.

E6. Selma Arzu VARDAR, Orkide PALABIYIK, Tülin YALTA, Serap TOPÇU,Zuhal GUKSU, Ruhan TOPUZ, Hakan KARADAĞ "Düşük akımlı iskemi sonrası atrial natriüretik peptid infüzyonunun izole sıçan kalbinde oluşturduğu hemodinamik değişikliklerde kısa süreli egzersizin rolü" 23. Ulusal Biyofizik Kongresi 2011

E7 Orkide PALABIYIK1, Levent ÖZTÜRK, Tammam SİPAHİ, Sibel GÜLDİKEN " Su ve gliserol kanalları akuaporin 7 ve 9'un tip 2 diyabetik ve/veya obez hastalarda gen polimorfizmleri" 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi 2012.

E8. Hilal Akseki, Selma Arzu Vardar, Muzaffer Demir, Orkide Palabiyik, Aziz Karaca, Zuhal Guksu, Arif Ortanca, Necdet Süt."Düzenli Egzersiz Yapan Sağlıklı Gençlerde Kısa Süreli Egzersiz Sonrası Plazma C-tipiNatriüretik Peptid Düzeyindeki Değişim" 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi 2012.

EKLER

Ek 1

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI BİLİMSEL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TUBADK 2011/93				
	PROTOKOL ADI	Su ve Gliserol Kanalı Akuaaporin 7 ve 9'un Diyabetik ve/veya Obez Hastalarda Gen Fölmorfizmleri				
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜN VANI / ADI	Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ					
	DESTEKLEYİCİ					
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	<input checked="" type="checkbox"/> Tek Merkez <input type="checkbox"/> Ulusal	<input type="checkbox"/> Çok Merkez <input type="checkbox"/> Uluslararası			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 09/ 07					Tarih: 20.04.2011
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında Görevli Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK'ün sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen doktora öğrencisi Orkide PALABIYIK'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin T.Ü. Araştırma Projeleri (TÜBAP) tarafından karşılanması koşuluyla gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına mevcudun oybirliği ile karar verilmiştir.					
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI: Helsinki Bildirgesi, İy Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TUBADK Yönergesi						
ÜYELER						
Ünvanı/Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Hakan KARADAĞ Başkan	Farmakoloji	T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Hasan ÜMİT Başkan Yardımcısı	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	İzinli
Doç. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyostatistik	T.Ü.T.F. Biyostatistik A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Biyoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Tunç KUTOĞLU Üye	Anatomi	T.Ü.T.F. Anatomi A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Erhan TABAKOĞLU Üye	Göğüs Hastalıkları	T.Ü.T.F. Göğüs Hastalıkları A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Figen KULOĞLU Üye	Enfeksiyon Hastalıkları	T.Ü.T.F. Enfeksiyon Hastalıkları A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Ömer Nuri PAMUK Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Yener YÖRÜK Üye	Göğüs Cerrahisi	T.Ü.T.F. Göğüs Cerrahisi A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	İzinli
Doç. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Ümit Nusret BAŞARAN Üye	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Yrd. Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Avukat Gülden ATILLA ÖZTÜRK Üye		T.Ü. Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü	K	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	

*Araştırma ile İlişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Murat DİKMENLİ
Dekan