

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

MTNR1B GENİ NÜKLEOTİT POLİMORFİZMLERİNİN NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI ETYOPATOGENEZİİLE İLİŞKİSİ

DEMET YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİBİYOLOJİVE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. FATİH EREN

2018-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi	: Yüksek Lisans
Anabilim Dalı	: Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi	: Demet YILMAZ
Tez Başlığı	: MTNR1B Geni Nükleotit Polimorfizmlerinin Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Etyopatogenezi ile İlişkisi
Sınav Yeri	: Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD
Sınav Tarihi	: 24.05.2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Doç. Dr. Fatih EREN	M.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Ayşe ÖZER	M.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	
Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp. Fak. Tıbbi Biyoloji AD	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun .07./06./2018 tarih ve 54 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.
-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Demet Yılmaz

İmza



I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca anlayışıyla beni destekleyen ve tez çalışmamın her aşamasında kıymetli bilimsel ve mesleki tecrübeleri ile yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Fatih Eren'e,

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki eğitimim süresince akademik bilgisi, güler yüzü ve anlayışıyla yanımda olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe Özer'e,

Yüksek lisans eğitimime değerli bilgileri ile katkıda bulunan Prof. Dr. Mustafa Akkiprik, Yrd. Doç. Dr. Can Erzik, Doç. Dr. İlter Güney'e,

Güler yüzleriyle yardımlarını esirgemeyen tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik ailesine,

Yardımlarından dolayı Alp Kibaroğlu ve İlayda Aksöz'e,

Birlikte çalıştığım için kendimi çok şanslı hissettiğim kıymetli arkadaşlarım Tuba Toker Göçmen ve Ayça Önal'a,

Desteklerini hep yanımda hissettiğim babam Kurtuluş Yılmaz'a, annem Zeliha Yılmaz'a, kardeşlerim Onur Yılmaz ve Ahmet Baki Yılmaz'a,

Kıymetli dostum Zeynep Zişan Gökçe'ye

SONSUZ TEŞEKKÜLERİMİ SUNARIM.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırıma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından, "SAG-C-YLP-120418-0157" numaralı proje ile desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR I

II. İÇİNDEKİLER II

III. ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ IV

IV. KISALTMA ve SİMGELER VI

1. ÖZET 1

2. SUMMARY 2

3. GİRİŞ VE AMAÇ 3

4. GENEL BİLGİLER 4

4.1 NASH (Nonalkolik Steatohepatit) **4**

4.1.1 NASH Etyopatogenezi **4**

4.2 Melatonin Reseptör 1B ve Pankreatik β Hücreleri Üzerine Etkisi **8**

4.2.1 MTNR1B ve Tip II Diyabet İlişkisi **10**

4.2.2 MTNR1B ve NASH İlişkisi **13**

4.3 Tek Baz Uzatma Reaksiyonu **14**

5. GEREÇ ve YÖNTEM 16

5.1 Araştırmada Kullanılacak Materyal ve Yöntemler **16**

5.1.1 Çalışmaya Alınma Kriterleri **16**

5.1.2 Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanma Koşulları **17**

5.1.3 Genomik DNA İzolasyonu **17**

5.1.4 DNA Sulandırımı ve Konsantrasyon Ölçümü **18**

5.1.5 Multipleks PZR ve Multipleks SBE Panel Primer Dizaynı **19**

5.1.6 Multipleks PZR Reaksiyonu **20**

5.1.7 Multiples PZR Reaksiyonu Sonrası Pürifikasyon **21**

5.1.8 Multipleks SBE Panel **22**

5.1.9 Multipleks SBE Panel Sonrası Purifikasyon **23**

5.1.10 Kapiler Elektroforez **23**

5.2 Sonuçların Analizi **24**

6. BULGULAR **26**

7. TARTIŞMA **34**

8. KAYNAKLAR **39**

9. ÖZGEÇMİŞ **44**

III. ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

Şekil 1: Serumdaki artmış glikoz ve insülinin hepatositler üzerindeki etkisi

Şekil 2: Pankreatik β hücresinde melatonin yolağı

Şekil 3: MNTR1B polimorfizmlarının T2D patogenezi üzerindeki etkisi

Şekil 4: rs10830963 G risk allelinin T2D gelişimi üzerindeki etkisi

Şekil 5: Multipleks SBE Reaksiyonu

Şekil 6: Multipleks PZRsonrası elde edilen amplikonlar. 6a.rs10830963 polimorfizmi 323 bp. 6b.rs2166706 polimorfizmi 376 bp. 6c.rs1387153 polimorfizmi 467 bp.

Şekil 7: rs10830963 singlepleks görüntüsü

Şekil 8: rs2166706 singlepleks görüntüsü

Şekil 9: rs1387153 singlepleks görüntüsü

Şekil 10: Heterozigot rs2166706, rs10830963 ve rs1387153 peakleri

Şekil 11: Homozigot rs2166706, rs10830963 ve rs1387153 peakleri

Şekil 12: Homozigot rs2166706, rs10830963 ve heterozigot rs1387153 peakleri

Resim 1: Multipleks PZR Sonrası Jel Görüntüsü (L: Ladder)

Tablo 1: Multipleks PZR primerleri ve ürün uzunlukları

Tablo 2: Multipleks SBE primerleri

Tablo 3: Multipleks PZR komponentleri

Tablo 4: Multipleks PZR koşulları

Tablo 5: Multipleks SBE komponentleri

Tablo 6: Multipleks SBE koşulları

Tablo 7: SNP-I metodu

Tablo 8: Çalışma grubunun demografik özellikleri

Tablo 9: Kontrol grubundaki rs10830963 polimorfizmi için HWE test sonuçları

Tablo 10: Kontrol grubundaki rs13837153 polimorfizmi için HWE test sonuçları

Tablo 11: Kontrol grubundaki rs2166706 polimorfizmi için HWE test sonuçları

Tablo 12: Polimorfizmlerin hasta ve kontrol grubunda dağılımı

IV. KISALTMA ve SİMGELER

AANAT: Arilalkilamin N asetiltransferaz

ASMT: Asetilserotonin O- metiltransferaz

Ca^{+2}: Kalsiyum

cAMP: Siklik adenozin monofosfat (adenilat)

cGMP: Siklik guanozin monofosfat (guanilat)

ChREBP: Karbonhidrat-duyarlı element bağlayıcı protein

CPT-I: Karnitin palmitol transferaz-I

DAG: Diaçil gliserol

ddNTP: Dideoksinükleotit trifosfat

DM: Tip 2 diyabet mellitus

DNL: De novo lipogenez

dNTP: Deoksinükleotit trifosfat

e^{-}: Elektron

ER: Endoplazmik retikulum

Exo-SAP: Ekzonükleaz - Shrimp alkalin fosfataz

FADH2: Flavin adenin dinükleotit

FFA: Serbest yağ asidi

GDM: Gebelik diyabeti

Gi: G inhibitör

GWAS: Genom boyu ilişki çalışması

HSL: Hormon duyarlı lipaz

HWE: Hardy-Weinberg Eşitliği

IP3: İnositol trifosfat

IR: İnsülin reseptörü

IRS: İnsülin reseptör substratı

JNK: Jun N-terminal kinaz

K3EDTA: Tripotasyum etilendiamintetraasetik asit

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

$MgCI_2$: Magnezyum klorür

mL: Mililitre

mRNA: messengerRNA

MTNR1A: Melatonin reseptör 1A

MTNR1B: Melatonin reseptör 1B

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit

NAFLD: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı

NASH: Non-alkolik steatohepatit

ng: Nanogram

nm: Nanometre

NO: Nitrik oksit

PI3K: Fosfotidil inozitol 3-kinaz

PKB: Protein kinaz B

PPARα: Peroksizom proliferatör-aktive reseptör α

PZR: Polimeraz zincir reakisyonu

ROS: Reaktif oksijen türevleri

rs number: SNP'lerin NCBI da kayıtlı oldukları referans numaraları

SAP: Shrimp alkalin fosfataz

SBE: Single base extension, tek baz uzatma

Sit-c: Sitokrom c

SNP: Tek nükleotit polimorfizmi

SREBP1-c: Sterol düzenleyici eleman bağlama proteini 1c

Taq: Thermus aquaticus

TCA: Trikarboksilik asit

TGF-ß: Transforman büyüme faktörü beta

TNF-α: Tümör nekrozis faktör-α

UTR: Kodlanmayan bölge

µl: Mikrolitre

MTNR1B Geni Nükleotit Polimorfizmlarinin Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Etyopatogenezi İle İlişkisi

Öğrencinin Adı: Demet Yılmaz

Danışmanı: Doç. Dr. Fatih Eren

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD

1. ÖZET

Amaç: Geniş bir spektruma sahip olan Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD); basit yağlanma, steatoz, fibroz oluşumu ile bazı ileri vakalarda siroz ve hepatoselüler karsinomayı kapsayan bir hastalık grubudur. NAFLD gelişimi insülin direnci, tip 2 diyabet (T2D), obezite ve metabolik sendrom ile yakından ilişkilidir. Non-alkolik steatohepatit (NASH) NAFLD'ın ileri evre bir hastalığıdır. Melatonin reseptör 1B (MTNR1B) geninin T2D gelişiminde güçlü bir aday gen olduğu iyi bilinmektedir. Bu gene ait rs1387153 (C/T), rs2166706 (C/T) ve rs10830963 (C/G) polimorfizmleri artmış açlık glikozu (hiperglisemi), azalmış insülin salınımı ve T2D riski ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmayla NASH'li hastalarda NAFLD etyolojisinde etkili olan komponentlerle ilişkilendirilmiş MTNR1B geni polimorfizmlerinin NASH gelişimi ve klinik özellikleri ile olası ilişkisini araştırmayı amaçlamaktayız. **Gereç ve Yöntem:** Çalışmamıza yaş ve cinsiyet eşleştirilmiş 100 biyopsi kanıtlı NASH hastası ve 100 sağlıklı kontrol birey dahil edilmiştir. Litaratürde ilk kez MTNR1B rs1387153 (C/T), rs2166706 (C/T) ve rs10830963 (C/G) polimorfizmlerine ait genotipleri tek bir reaksiyonda tespit eden mültipleks tek baz uzatma paneli (Multiplex - Single Base Primer Extension, SBE) dizayn edilmiştir. **Bulgular:** Hasta ve kontrol gruplarında MTNR1B polimorfizmlerine ait genotip ve allel frekansları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ayrıca NASH'in histolojik, demografik ve klinik alt grupları arasında da herhangi bir ilişki gözlenmemiştir. **Sonuçlar:** MTNR1B'daki mevcut polimorfizmlerin NASH komponentleri ile ilişkili olmasına rağmen hastalığın patogenezinde rol oynamadığı gösterilmiştir. Ancak bu çalışma MTNR1B'nın NASH ile ilişkisinin sorgulandığı ilk araştırmadır. Bu nedenle bu bulguların ve gene ait diğer polimorfizmlerin farklı coğrafi ve etnik daha geniş gruplarda çalışılarak test edilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: NASH, T2D, MTNR1B, Polimorfizm, Multipleks SBE

The Association of MTNR1B Gene Nucleotide Variations with the Etiopathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

Researcher: Demet Yılmaz

Advisor: Doç. Dr. Fatih Eren

Department: Medical Biology and Genetics

2. SUMMARY

Aim: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has a broad range spectrum comprised of simple steatosis, steatohepatitis, fibrosis formation. In some severe cases of NAFLD may lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. NAFLD development is closely associated with insulin resistance, type II diabetes (T2D), obesity and metabolic syndrome. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a severe form of NAFLD. Melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene has known to be a strong candidate gene for T2D development. MTNR1B polymorphisms [rs1387153 (C/T), rs2166706 (C/T) and rs10830963 (C/G)], were associated with decreased insulin release, elevated fasting glucose and increased risk of type 2 diabetes. We purposed to investigate potential relationship with MTNR1B polymorphisms to NASH development and clinical features in this study. **Methods:** 100 biopsy-proven NASH patients and 100 age and gender-matched controls were enrolled in our study. For the first time in the literature, multiplex single base primer extension (Multiplex SBE) panel was designed to detect MTNR1B polymorphisms in one reaction. **Results:** Genotype and allele frequencies of MTNR1B polymorphisms were not significantly different between case and controls. They were also not found to be associated with histological, demographic and clinical subgroups of NASH. **Conclusion:** Although MTNR1B polymorphisms are related to NASH components, they appears not to be involved in pathogenesis of NASH. But this study is the first investigation of examining the association of MTNR1B with NASH. Therefore, these findings and other MTNR1B polymorphisms should be tested in the larger study groups in the different geographic area and ethnic populations.

Keywords: NASH, T2D, MTNR1B, Polymorphism, Multiplex SBE

3. GİRİŞ VE AMAÇ

NAFLD, enfeksiyon ve alkol kullanımı olmaksızın karaciğerde aşırı yağ birikmesi ile karakterize bir hastalık spektrumudur. Bir NAFLD grubu hastalığı olan NASH, hepatositlerde balonlaşma, Mallory cisimcikleri ve inflamasyon ile basit steatozdan ayrılır. İnsülin direnci, T2D, obezite ve metabolik sendrom NAFLD gelişimine etki eden komponentlerdir.

Melatonin mevsimsel ve sirkadiyen ritmin düzenlemesinde rol oynar ve etkisini G-protein bağlı plazma membran reseptörleri aracılığıyla gösterir. Melatonin reseptörlerinden biri olan MTNR1B pankreatik β hücrelerinde G inhibitör (Gi) protein aracılığı ile insülin salınımını azaltırken, Gq proteini aracılığı ile insülin salınımını artırır. İnsülin salınımı üzerindeki etkisi göz önüne alınırsa MTNR1B geninde meydana gelebilecek fonksiyon kaybı veya kazancı durumu T2D patogenezine katkı sağlar. Yapılan çalışmalarla MTNR1B geni rs1387153 (C/T), rs2166706 (C/T) ve rs10830963 (C/G) polimorfizmlerinin artmış açlık glikozu ve T2D ile ilişkilendirilmiş olması; muhtemelen NAFLD etyopatogenezinde de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Nitekim MTNR1B polimorfizmlerinin oluşturduğu etki NAFLD etyopatogenizdeki insülin direncine benzemektedir.

Ayrıca NAFLD'lı hastaların %15-20'sinde T2D görülmektedir. Dolayısıyla insülin salınımında meydana gelen bozulmalar hepatik yağlanmaya yol açarak hastalığı NASH'e götürebilir. Bu yüzden insülin mekanizmasını olumsuz yönde etkileyebilecek bu polimorfizmlerin, hepatik yağlanmayı da olumsuz yönde etkileme olasılığı vardır ve bu polimorfizmlerin NASH gelişiminin klinik özellikleri ile muhtemel bağlantısı araştırılmalıdır.

Bu çalışmada, NASH'li hastalarda MTNR1B genindeki polimorfizmlerin tespit edilmesi ve bu polimorfizmlerin NASH ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 NASH

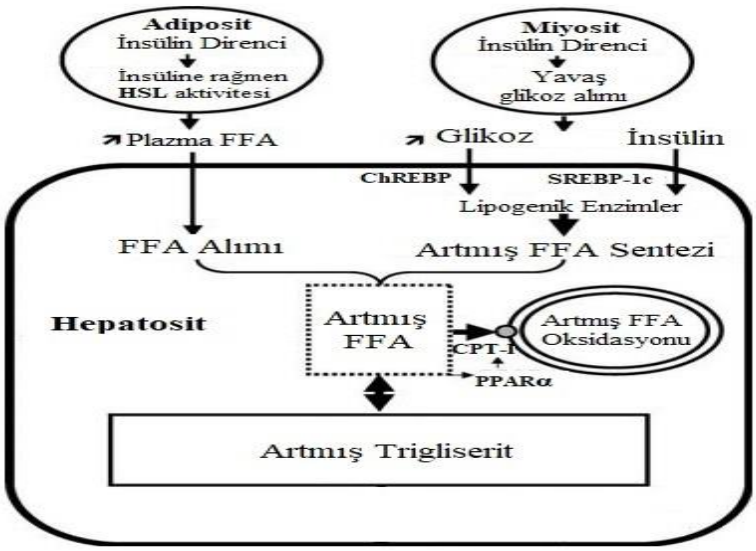
Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), enfeksiyon ve alkol kullanımı olmaksızın mikroskobik incelemede karaciğerdeki yağ damlacıkları içeren hepatositlerin %5'ten fazla olması şeklinde tanımlanabilir (Boğa, 2014; Engin ve Engin, 2017). NAFLD, obez ve diyabetik bireyler arasında yaygın görülür; fakat bu hastalıklara sahip olmayan bireylerde de görülebilen bir durumdur. Geniş bir spektruma sahip olan NAFLD; basit yağlanma, steatoz ve sonrasında hastalığın ileri formu olan steotohepatite dönüşebilir. Bu hastalık NAFLD'ın ciddi bir formu olup fibroz, siroz ve hepatoselüler karsinoma gibi ciddi komplikasyonlara sahiptir (Benedict ve Zhang, 2017). NAFLD gelişiminde rol oynadığı bilinen temel komponentler insülin direnci, tip 2 diyabet (T2D), obezite ve metabolik sendromdur. Hatta bazı kaynaklarda NAFLD'ın metabolik sendromun hepatik ayağını temsil ettiği söylenir (Reccia ve ark., 2017). NAFLD spektrumu içerisinde NASH'i basit yağlanmadan ayıran en önemli kriterler hepatositlerde balonlaşma, Mallory cisimcikleri ve inflamasyondur (Benedict ve Zhang, 2017). Basit steatoz vakalarının %20-30'u NASH'e ilerler (Reccia ve ark., 2017).

4.1.1 NASH Etyopatogenezi

NASH patogenezi çift vuruş olarak adlandırılan hipotez ile açıklanır. İlk vuruş; hareketsiz yaşam, yağdan zengin diyet, obezite, insülin direnci ve hepatositlerde yağ birikimini içerirken, ikinci vuruş NASH progresyonunu artıracak fibrogenez ile ilgili inflamatuvar olayları aktive eder (Benedict ve Zhang, 2017).

NASH gelişiminde ilk vuruş sistemik bir insülin direncinin ortaya çıkmasıdır. İnsülin direnci, hepatositlerde serbest yağ asitlerinin (FFAs) birikmesine sebep olur. Bunu da hem adipositlerde lipolizi artırıp hepatositlere daha fazla serbest yağ asidi alınmasına neden olarak hem de hepatositlerde de novo lipogenezi (DNL) artırarak

yapar. İnsülin direnci, insüline duyarlı hücrelerin (miyosit, adiposit, hepatosit) insüline karşı duyarlılığını yitirmesidir. Yapılan çalışmalarda karaciğerdeki yağ içeriği ile insülin duyarlılığı arasında ters bir ilişki olduğu bulunmuştur (Engin ve Engin, 2017). Normal şartlarda insülin hücre zarında bulunan insülin reseptörü (IR) aracılığı ile insülin reseptör substratı (IRS) aktive eder ve devamında sırası ile fosfotidil inozitol 3-kinaz (PI3K) ve protein kinaz B (PKB) aktive edilerek glikoz transportları aracılığı ile hücre içine glikoz alınımı sağlanır (Pessayre ve Fromenty, 2005). Hareketsiz yaşam, artmış yağ birikimi ve mitokondriyal bozukluklar sonucu insülin direnci gelişir ve insülin varlığına rağmen IRS, Jun N terminal kinaz (JNK) tarafından fosforilasyona uğratılarak baskılanır. Bunun sonucunda hücre içine glikoz alımı azalır (Reccia ve ark., 2017). Azalmış glikoz alımından dolayı serumdaki glikoz seviyesi yüksek kalır. Pankreatik β hücreleri bu durumu düzeltebilmek için insülin salınımını artırarak hiperinsülinemi gelişmesine sebep olur (Pessayre ve Fromenty, 2005). Normal şartlarda insülin, adipositlerde hormon duyarlı lipazı (HSL) baskılayarak lipolizi engeller. İnsülin direnci durumunda HSL inhibe olmadığı için lipoliz ve dolaşıma salınan serbest yağ asidi seviyesi artar. Buna bağlı olarak karaciğere yağ asidi alımı artar (Reccia ve ark., 2017). Serumdaki artmış glikoz ve insülin iki farklı yoldan hepatositlerde serbest yağ asidi sentezini artırır. İnsülin, sterol düzenleyici eleman bağlama protein 1c (SREBP-1c, sterol regulatory element-binding protein) üzerinden DNL artırır (Şekil 1). SREBP-1c, malonil-CoA'nın aşırı olarak sentezlenmesine neden olur. Malonil-CoA lipogenezin substratı olduğu için FFA sentezini artırırken öte yandan β oksidasyonun regülasyonunun bozulmasına sebep olur. Çünkü artmış FFA'e karşılık peroksizom proliferatör-aktive reseptör (PPARα, peroxisome proliferator-activated receptor alpha) aktivasyonu ile karnitin palmitoil transferaz-I (CPT-I, carnitine palmitoyltransferase 1) miktarı artar ve inhibitörü olan malonil-CoA' ya karşı afinitesini kaybeder. Böylece lipogenezin yanı sıra β oksidasyon da artmış olur (Reccia ve ark., 2017; Benedict ve Zhang, 2017). Yine serumda artmış olan glikoz ise karbonhidrat-duyarlı element bağlayıcı protein (ChREP, carbohydrate-responsive element-binding protein) üzerinden DNL'yi artırıp hepatositlerde FFA birikimine neden olur (Engin ve Engin, 2017). Serumdaki artmış glikoz, insülin ve FFA hepatositleri olumsuz etkiler.



Şekil 1: Serumdaki artmış glikoz ve insülinin hepatositler üzerindeki etkisi (Pessayre ve Fromenty, 2005. Şekil yazıları Türkçeleştirilmiştir)

İkinci vuruş ise inflamasyon ve bazı vakalarda fibrozis gelişimini içererek, NASH'e progresyonunu artırır. İnflamasyon ve fibroz gelişiminden oksidatif stres, lipotoksite, mitokondriyal bozukluklar ve tümör nekrozis faktör (TNFα, tumor necrosis factor alpha) gibi sitokinler sorumludur (Boğa, 2014; Engin ve Engin, 2017).

Hepatositlerde depolanan yağın kaynağı adipositlerden lipoliz yoluyla dolaşıma geçen FFA ile hepatositlerde ki DNL' dir. Karaciğerdeki yağ asitlerinin miktarı, hepatik yağ asidi alımı ve alınan yağ asitlerinin tüketilmesi ile dengede tutulur. Hepatositlere alınan FFA'i ya mitokondriyal β oksidasyona uğratılırlar ya da düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) şeklinde karaciğerden uzaklaştırılırlar. Ancak yağ asitlerinin LDL şeklinde uzaklaştırılmasının NAFLD'da azaldığı görülür (Engin ve Engin, 2017; Reccia ve ark., 2017). Diğer taraftan uzun zincirli FFA, CPT-I aracılığıyla matrikse alınırlar ve burada β oksidasyona uğratılarak asetil-CoA'lara parçalanıp trikarboksilik asit döngüsüne (TCA) katılırlar. Bu döngüde NADH ve FADH2 oluşur ve bunların elektronları (e-) solunum zincirine aktarılır. Sitokrom c oksidaz aracılığı ile e- lar oksijen ve protonlar ile birleşerek su oluştururken,

protonlar (H+) intermembran boşluğa geçer ve ATP üretmek için ATPsentaz aracılığı ile tekrar matrikse girerler (Pessayre ve Fromenty, 2005).

Artmış yağ asiti yükünden dolayı hepatositlerde yağ oksidasyonu artar. Artan β oksidasyondan dolayı solunum zincirine yüksek miktarda elektron girişi olur ve bu elektronların komplekste birikmesi sonucunda reaktif oksijen türevleri (ROS) artar. Karaciğerdeki mitokondriyal β oksidasyonun yanı sıra, serbest radikal üretimini artıran olaylar; lipitlerin peroksidasyonu, hiperinsülemi ve uzun zincirli yağ asitlerinin peroksizomlar tarafından β oksidasyona uğratılmasıdır (Boğa, 2014; Reccia ve ark., 2017). Tüm bunların sonucunda artmış ROS'a karşılık yetersiz kalan antioksidant kapasitesi NASH progresyonunda kritik rol oynar (Engin ve Engin, 2017; Pessayre ve Fromenty, 2005).

NASH progresyonuna etki eden diğer bir faktör ise lipotoksisitedir. Doymuş ve trans yağ asitlerinin lipit metabolizmasına zıt etkisi vardır. Bunlar karaciğerde lipotoksiteden dolayı inflamasyonu artırıyor olabilir. Doymuş yağlar, endoplazmik retikulum (ER) stresini uyarır ve bu da hücresel disfonksiyon ve apoptoza sebep olur (Reccia ve ark., 2017).

Son olarak mitokondriyal disfonksiyonu elde aldığımızda; NASH'li hastalarda mitokondriyal solunum zincir kompleksi aktivitesinin önemli derecede azaldığı görülmektedir. Bu da bize mitokondriyal disfonksiyonun da NASH gelişiminin önemli bir unsuru olduğunu açıkça gösterir (Pirola ve ark., 2012). Bozulmuş solunum zincir aktivitesinin yanı sıra NASH'li hastalarda şişmiş mitokondri ve bozuk beta oksidasyon görülür. Karaciğerde oksitadif stres, inflamatuvar kaskatı tetikler ve karaciğer hasarına yol açar. ROS aracılıklı hücre hasarı, DNA zararı, FFA oksidasyonu hücre membranının bütünlüğünün bozulmasına sebep olur ve proinflamatuvar sitokinler salınır (Reccia ve ark., 2017).

Karaciğerde, inflamatuvar sitokinler Kupffer ve hepatik yıldızsı hücreleri tarafından salınır ve hücre ölümü, inflamasyon ve fibrozu tetikler (Reccia ve ark., 2017). TNFα, mitokondriyal membran permabilazyonunu artırarak sitokrom c'nin intermembrana salınımına yol açar ve apoptoza sebep olur (Engin ve Engin, 2017).

Apoptoz, kompleks bir süreçtir ve NASH gelişiminde çeşitli faktörler (ER stresi, ROS oluşumu, lizozomal ve mitokondrial disfonksiyonlar) ekstrinsik ve intirisik yolaklar üzerinden apoptoza sebep olur. Karaciğerde apoptoz, inflamasyonu başlatır. FAS ve FAS ligant etkileşimi ve TNF α ve reseptörü apoptozta görevli olan kaspazları uyararak apoptoza sebep olurlar (Reccia ve ark., 2017; Pessayre ve Fromenty, 2005).

Apoptoz gelişimini takiben dokularda fibroz oluşumu gözlenir. Fibrozdan sorumlu önemli sitokinlerden biri TGF-β'dır. TGF-β karaciğerde, Kuppfer ve yıldızsı hücrelerinden salınır. TGF-β, yıldızsı hücrelerini miyofibroblast benzeri hücrelere dönüştürerek Tip I kollajen sentezini artırarak fibroz gelişimini başlatır. Adipositlerden salınan Leptin hem Kuppfer ve yıldızsı hücrelerini uyararak TGF-β sentezini hem de yıldızsı hücreleri aracılığı ile doğrudan kolajen oluşumunu artırır (Boğa, 2014).

4.2. Melatonin Reseptör 1B ve Pankreatik β Hücreleri Üzerine Etkisi

Melatonin, pineal bezden salınan bir hormondur. En iyi bilinen görevi mevsimsel ve sirkadiyen ritmi düzenlemektir. Pinealositlerde melatonin sentezinin ilk basamağı triptofanın serotonine dönüştürülmesidir (Şekil 2). Daha sonrasında arilalkilamin N asetiltransferaz (AANAT, Aralkylamine N-Acetyltransferase) serotinini asetiller. Asetillenmiş serotonin (N asetilserotonin), asetilserotonin O-metiltransferaz (ASMT, Acetylserotonin O-Methyltransferase) tarafından melatonine dönüştürülür (Mulder ve ark., 2009; Emet ve ark., 2016; Chang ve ark., 2016). Melatonin etkisini, G-protein bağlı plazma membran reseptörleri üzerinden gösterir (Zhang ve ark., 2014; Mulder ve ark., 2009).

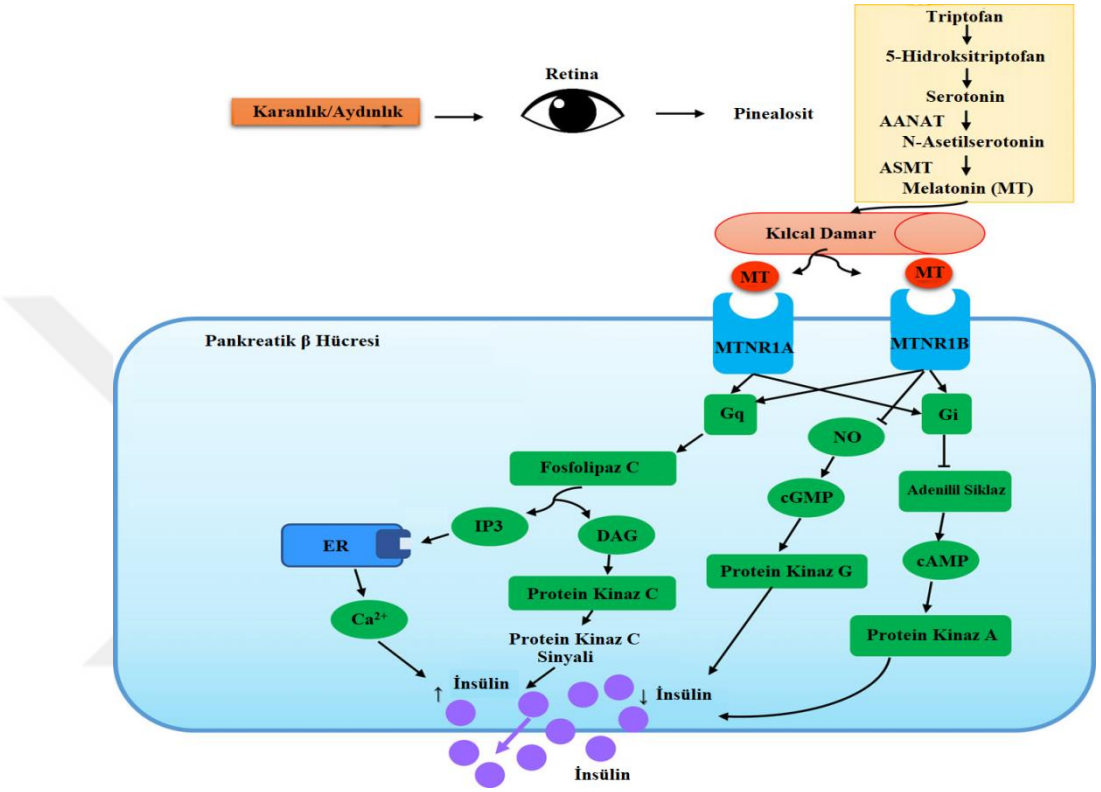
Melatoninin gece boyunca yüksek olan ekspresyonu gündüz düşmektedir. İnsülin seviyesine bakıldığında ise tam tersi bir durum söz konusudur. İnsülin seviyesi gece boyunca düşüktür ve bu da kısmen de olsa insülinin, melatonin tarafından kontrol edildiğini düşündürmektedir. Melatonin bu kontrolü, melatonin reseptör aracılığı ile insülin salınımını inhibe ederek yapar. Melatonin reseptörleri birçok dokuda eksprese olur. Bunlardan biri de pankreas adacıklarıdır. Pankreatik β

hücrelerinde melatonin reseptörleri (Melatonin reseptör 1A, MTNR1A ve Melatonin reseptör 1B, MTNR1B) G inhibitör (Gi) protein aracılığı ile hücre içerisindeki adenilat siklazı inhibe ederek cAMP seviyesinin düşmesine yol açar. cAMP'nin seviyesindeki bu azalış pankreatik β hücrelerinde insülin salınımın azalması ile sonuçlanır (Mulder ve ark., 2009; Ekmekcioglu, 2006).

MTNR1B geni, 11 kromozomun uzun kolun (11q21-22)'da lokalize olmuş, G-protein bağlı reseptör ailesinin bir üyesidir. Fonksiyonel ve yüksek afiniteli bir melatonin reseptörü kodlamaktadır (Zhang ve ark., 2014). 2 adet ekzonu vardır ve 363 amino asit içerir. Nükleotit sekansı MTNR1A ile %60 homolojiye sahiptir. MTNR1B hem siklik adenozin monofosfat (cAMP)'ı inhibe ederek hem de guanilat (siklik guanozin monofosfat, cGMP) oluşumunu inhibe ederek insülin salınımını engeller (Emet ve ark., 2016; Müssig ve ark., 2010). Melatonin pankreatik β hücrelerinin membranında bulunan reseptörlerine (MTNR1A ve MTNR1B) bağlandığında Gi proteini aracılığı ile adenilat siklazı baskılayarak cAMP oluşumunu engeller (Şekil 2). Adenilat siklazın baskılanması sonucu hücre içerisinde cAMP seviyesi azalır ve buna bağlı olarak protein kinaz A inaktif formda kalarak, kalsiyum kanallarından hücre içine Ca2+ girişinin azalmasına neden olur. Tüm bunların sonucunda pankreatik β hücrelerinden insülin salınımı azalır. Ayrıca MTNR1B, nitrik oksitin (NO) uyardığı cGMP oluşumunu da engeller ve buna bağlı olarak protein kinaz G inaktif formda kalır. Bu durumda da kalsiyum kanallarından hücre içine Ca2+ girişini azaltarak pankreatik β hücrelerinde insülin salınımının azalmasına sebep olur. MTNR1A ve MTNR1B'nin insülin salınımı üzerindeki inhibe edici etkisinin yanı sıra, Gq proteini aracılığı ile insülin salınımını artırıcı etkisi de vardır. MTNR1A ve MTNR1B, Gq proteini aracılığı ile fosfolipaz C'yi uyararak inositol trifosfat (IP3) ve diaçil gliserol (DAG) seviyelerini artırır. IP3, ER'den hücre içerisine Ca2+ salınımını artırırken, DAG ise protein kinaz C'yi aktive eder ve tüm bunların sonucunda pankreatik β hücrelerinden insülin salınımı artar (Mulder ve ark., 2009; Sharma ve ark., 2015; Chang ve ark., 2016).

Yapılan çalışmalarda Klonal β hücrelerinde melatoninin cAMP oluşumunu inhibe ettiği ve MTNR1B nin aşırı eksprese olduğu durumda cAMP yanıtının geciktiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Farelerde yapılan çalışmalarda

MTNR1B nin knockout edildiği durumda langerhans adacıklarında glikoza verilen insülin yanıtının daha güçlü olduğu görülmüştür (Mulder, 2017). MTNR1B nin antagonistiği olan Luzindole ile melatoninin β hücrelerindeki insülin salınımını inhibe edici etkisinin ortadan kaldırabildiği gösterilmiştir (Müssig ve ark., 2010).



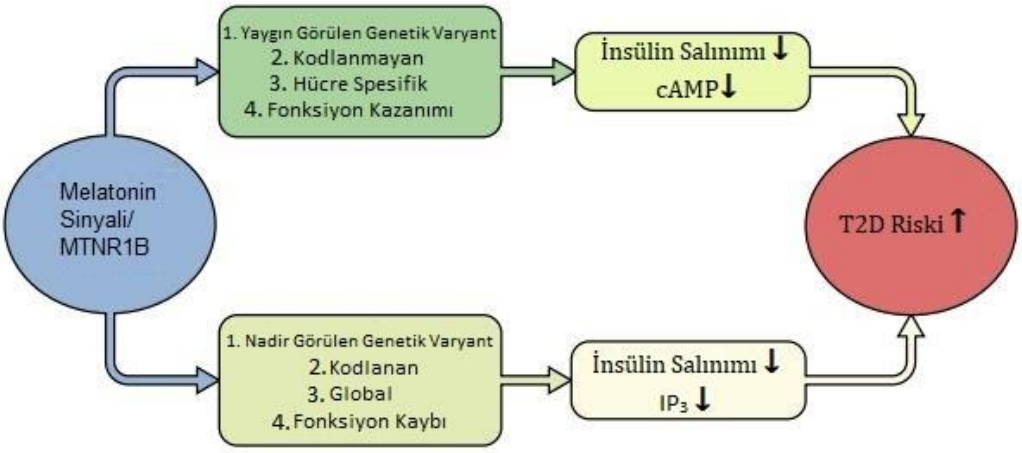
Şekil 2: Pankreatik β hücresinde melatonin yolağı (Chang ve ark., 2016. Şekil yazıları Türkçeleştirilmiştir)

4.2.1 MTNR1B ve Tip II Diyabet İlişkisi

2009 yılında yapılan genom boyu ilişki çalışmaları (GWAS) sonucunda hem Avrupalı hem de Asyalı bireylerde T2D ile ilişkilendirilen ortak lokuslar bulunmuştur. Bunlardan biri olan MTNR1B geni T2D gelişiminde güçlü bir aday gendir (Garaulet, 2015). Ayrıca açlık glikozu düzeyi üzerine etkisi olan tek aday gendir. MTNR1B polimorfizm; rs1387153 (C/T), ve rs2166706 (C/T) artmış açlık glikozu (hiperglisemi) ve T2D riski ile ilişkilendirilmiştir, bir diğer MTNR1B

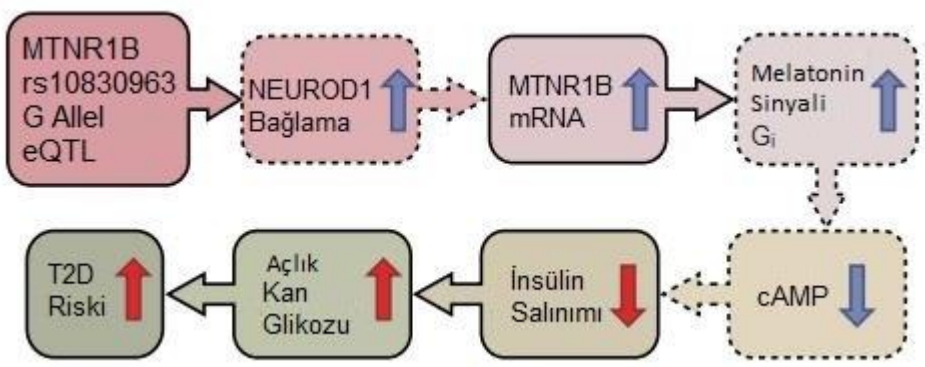
polimorfizmi olan rs10830963 (C/G) ise bahsetmiş olduğumuz risklerin yanında azalmış insülin salınımı ile de ilişkilendirilmiştir (Müssig ve ark., 2010; Arıkoğlu ve Kaya, 2015). Bu özellikler ile ilişkilendirilmiş olan rs2166706 ve rs1387153 MTNR1B geninin 5' UTR bölgesinde, rs10830963 ise intron1 bölgesinde lokalizedir (Müssig ve ark., 2010).

Bu genetik polimorfizmlerin T2D gelişimini nasıl etkilediği şu şekilde açıklanabilir. MTNR1B geninde Gq ile etkileşim kaybına yol açan genetik polimorfizmler nadir görülür ve kodlanan bölgede meydana gelen değişikliğe bağlı olarak tüm hücrelerde genin ekspresyonunu bu yönde etkiler. Buna örnek olarak normalde MTNR1B reseptörü Gq ikincil haberci üzerinden insülin salınımını artırması beklenirken fonksiyon kaybettirici polimorfizmler nedeniyle Gq aktivasyonunun ve dolayısıyla da insülin salınımının azalmasına neden olmaktadır. Fonksiyon kazandıran genetik polimorfizmlerde ise kodlanmayan bölgelerde değişiklikler meydana gelir ve bu bölgeler metilasyon seviyesi, kesim (splicing) ve kromatin yapısını değiştirerek gen regülasyonunu etkiler. Fonksiyon kaybettirici polimorfizmlerin aksine kazandırıcılar Gi ikincil haberci üzerinden insülin salınımını azaltıcı etkisini kuvvetlendirirler. Böylelikle MTNR1B reseptörü ile aktifleşen ve etkileri farklı olan iki yolak üzerinden de insülin salınımı baskılanmış olur. Bu nedenle her iki yolağa etki eden polimorfizmlerin incelenmesi önemli bir husustur (Şekil 3). Fonksiyon kaybettirici etkininin görüldüğü bu yolak hücre veya doku spesifik gerçekleşmektedir. Bu nedenle aslında MTNR1B geninin 5' UTR bölgesinde yer almasına karşın rs10830963 polimorfizminin neden β hücrelerinde insülin salınımını inhibe ettiği anlaşılmaktadır. Sonuç olarak hem fonksiyon kaybı hem de kazancı durumu T2D patogenezine katkı sağlar (Mulder, 2017).



Şekil 3: MNTR1B polimorfizmlarının T2D patogenezi üzerindeki etkisi (Mulder, 2017. Şekil yazıları Türkçeleştirilmiştir)

Hayvan ve insan çalışmaları sayesinde, melatoninin glikoz homeostazı üzerinde önemli rolü olduğu bilinmektedir. MTNR1B risk polimorfizmları glikozun uyardığı insülin salınımını değiştirerek β hücre fonksiyonunu etkiler. MTNR1B risk polimorfizmlarını taşıyan bireylerde 7 yıllık periyotta insülin salınımının daha hızlı bozulduğu rapor edilmiştir (Müssig ve ark., 2010). Bu polimorfizmlardan biri olan rs10830963 G risk allelini taşıyan bireylerde MTNR1B mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Mulder, 2017). Yine aynı çalışmada MTNR1B'nin aşırı ekspresyonunun, klonal β hücrelerinde insülin salınımını güçlü bir şekilde inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 4). Diğer bir çalışmada ise G risk allelini taşıyan bireylere 3 ay boyunca günlük 4 mg melatonin verildiğinde bireylerde glikoz toleransının ve insülin yanıtının ileri derecede azaldığı gözlemlenmiştir (Mulder, 2017). rs10830963 G risk allelinin Asyalı (Çin, Japon ve Sri Lanka populasyonlarında) ve Alman bireylerde artmış kan glikozu ve T2D ile ilişkilendirilirken, Çekli kadınlarda Gestasyonel Diyabet (Gebelik Diyabeti, GDM) gelişim riskini artırdığı rapor edilmiştir. Tüm bu sonuçlardan anlaşılacağı üzere rs10830963 polimorfizmine ait G allelinin bozulmuş erken insülin salınımı, pankreatik β hücre disfonksiyonu ve T2D için bireye yatkınlık kazandırdığı gözlenmektedir. Bu nedenle rs10830963 G alleli belirtilen populasyonlarda belirtilen hastalıklar için bir risk alleli olarak tespit edilmiştir (Sharma ve ark., 2015).



Şekil 4: rs10830963 G risk allelinin T2D gelişimi üzerindeki etkisi (Mulder, 2017. Şekil yazıları Türkçeleştirilmiştir)

Diğer bir MTNR1B polimorfizmi olan rs1387153 T allelinin Avrupa populasyonunda açlık glikozunu ve T2D riskini artırdığı rapor edilmiştir (Bouatia-Naji, 2009). Hintli Asyalı populasyonunda yapılan çalışmada ise rs2166706 C allelinin T2D ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Chambers ve ark., 2009).

4.2.2 MTNR1B ve NASH İlişkisi

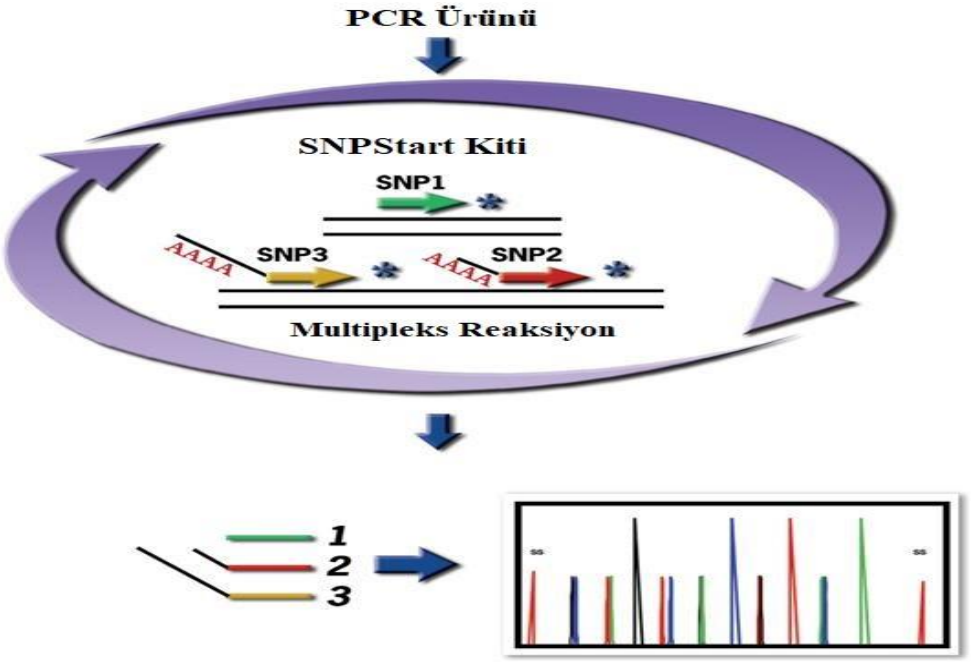
MTNR1B polimorfizmlerinin NAFLD etyopatogenizde ki rolü bilinmemektedir. Ayrıca litaratürde bu güne kadar yapmış olduğumuz araştırmalara göre yapılmış bir çalışmada mevcut değildir. Ancak MTNR1B polimorfizmlerinin insülin direnci, obezite ve T2D ile ilişkili olması muhtemelen NAFLD etyopatogenezinde de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Nitekim MTNR1B polimorfizmlerinin oluşturduğu etki NAFLD etyopatogenizdeki insülin direncine benzemektedir. Normalde insülin adipositlerde hormon duyarlı lipazı (HSL) baskılayarak lipolizi engeller. Ancak insülin direnci durumunda bu inhibisyon ortadan kalkar. Kurmuş olduğumuz hipoteze göre aynı etki MTNR1B de meydana gelen polimorfizmlerinin yol açtığı insülin seviyesinin azalmasına bağlı olarak meydana gelebilir veya mevcut duruma katkıda bulunabilir. Sonuç olarak lipolizin aktivasyonu ve dolaşıma salınan serbest yağ asidi seviyesi yükselerek karaciğerde birikerek yağlanmaya neden olur. Ayrıca MTNR1B polimorfizmlerinin artmış açlık glikozu ile ilişkili olduğu

bilinmektedir (Mulder, 2017). Bu durumda da serumda ki artmış glikoz ChREP (carbohydrate-responsive element-binding protein) üzerinden de DNL'yi artırıp hepatositlerde FFA birikimine neden olabilir.

NASH etyopatogenezinde bahsedildiği gibi hastalığın gelişiminde ilk adım insülin direncinin meydana gelmesidir. NAFLD'lı hastaların %15-20'sinde T2D görülür. İnsülin salınımında meydana gelen bozulmaların yanı sıra yukarıda bahsedilen durumlarda göz önüne alındığında tüm bunlar hepatik yağlanmaya yol açarak hastalığı basit yağlanmadan steatohepatite götürebilir. Dolayısıyla insülin mekanizmasını olumsuz yönde etkileyebilecek genetik polimorfizmlerin, hepatik yağlanmayı da olumsuz yönde etkileme olasılığı vardır. Bu sebeple MTNR1B genindeki polimorfizmlerin NAFLD gelişiminin klinik özellikleri ile muhtemel bağlantısı araştırılmalıdır.

4.3 Tek Baz Uzatma Reaksiyonu

Tek baz uzatma reaksiyonu (Single Base Extension – SBE) bilinen SNP bölgeleri için kullanılabilecek bir yöntemdir. SBE yönteminde kullanılacak olan tespit (interrogation) primeri 3' veya 5' yönünde hedef nükleotidin bir baz önünde kalıba yerleşecek şekilde dizayn edilmelidir. Tespit primeri, DNA polimeraz ve floresan işaretli dideoksinükleotitlerin (ddNTP) varlığında gerçekleşen SBE reaksiyonunda DNA polimeraz kalıp DNA'da ki hedef nükleotidin komplementeri olan ddNTP'yi primere ekleyerek terminasyon meydana getirir (Doi ve ark., 2004). Böylece tespit primerinden bir nükleotit daha uzun bir fragman elde edilmiş olunur(Şekil 5). Elde edilen bu fragmanlar sekans cihazında yürütüldüğünde ddNTP'lerin yaptıkları ışımaya göre hedef bölgede hangi nükleotit olduğu belirlenir. Tek baz uzatma metodu multipleks çalışmaya uygun bir yöntemdir. Multipleks SNP analizi yapılacağı zaman tespit primerlerinin uzunlukları arasında en az 4-8 baz aralık olmalıdır. Primerler arasındaki uzunluk farkı 3' veya 5' uca homopolimerik kuyruk (poliA veya poliT) eklenerek sağlanır (Doi ve ark., 2004).



Şekil 5: Multipleks SBE Reaksiyonu (https://sciex.com/one-capillary-array/single-base-extension. Erişim tarihi: 11 Nisan 2018 Şekil yazıları Türkçeleştirilmiştir)

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Araştırmada Kullanılan Materyal ve Yöntemler

Bu çalışmada toplam 200 örnekte (kontrol ve hasta grubu) MTNR1B genindeki rs10830963, rs1387153 ve rs2166706 polimorfizmleri multipleks SBE panel ile araştırıldı. Hastalara ait tüm biyopsilerin sınıflandırılması için Steatoz, Aktivite, Fibroz (SAF) skorlama sistemi kullanıldı. NASH tanısı; yağlanma, lobüler inflamasyon ve balonlaşma kriterlerinden en az 1 puan almak şartı ile konuldu. Çalışmaya bu kriterlere uyan, yaş ortalamaları 44 olan eşit sayıda erkek ve kadından oluşan 100 NASH hastası ile hastalarla yaş-cinsiyet eşleştirilmesi yapılmış 100 sağlıklı kontrol alınmıştır.

5.1.1 Çalışmaya Alınma Kriterleri

Günlük alkol alım miktarı; kadınlarda 20 g, erkeklerde 40 g'ı aşanlar çalışmaya alınmayacaktır. Çalışmaya yeni alınacak hastalar daha önce biyopsisi yapılarak NAYKH (son 1 yıl içinde biyopsi yapılmış hastalar) tanısı almış hastalar arasından seçildi. Hastaların mevcut klinik, laboratuvar ve radyolojik bulgularından yararlanıldı. Kontrol grubu polikliniklere başvuran kronik hastalığı olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan, karaciğer fonksiyon testleri normal bireylerden seçildi. Hastaların karaciğer biyopsi materyalleri aynı patolog tarafından Diyabet ve Sindirim ve Böbrek Hastalıkları Ulusal Enstitüsü (NIDDK) NASH Clinical Research Network skorlama sistemine göre yeniden değerlendirildi. Bu sınıflama sistemine göre kesin NASH hastaları çalışmaya dahil edildi. Sağlıklı gönüllülerin akraba olmaması bilinen herhangi bir hastalığının olmamasına dikkat edildi.

5.1.2 Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanma Koşulları

Çalışmaya katılan her bireyden; multipleks SBE panelde kullanılacak DNA'nın izolasyonu için 2'şer ml olmak üzere toplam 6 ml kan alınıp 3 ayrı K3EDTA'lı (tripotasyum etilendiamintetraasetik asit) tüpe alikotlandı. Tüm kanlar en geç bir hafta içinde izole edilmek amacıyla -80 °C'ye kaldırıldı.

5.1.3 Genomik DNA İzolasyonu

Toplanan kanlardan "Pure Link Genomic DNA Purification Kit" (Invitrogen, ABD) ile üretici firmanın talimatnamesine göre genomik DNA izolasyonu yapıldı.

1. Isı bloğu 55°C'ye ayarlandı.

2. 200 µl kan örneği ependorfa konuldu.

3. 20 µl Proteinaz K eklendi.

4. 20 µl RNase A eklenip, vortekslendi. Oda sıcaklığında, 2dk inkübe edildi.

5. 200 µl Lysis/Binding Buffer eklenip vortekslendi.

6. 55°C'de 10dk bekletildi.

7. 200 µl %96-100 ethanol eklenip 5 sn vortekslendi.

8. Hazırlanan lizat, spin kolona eklendi.

9. Oda sıcaklığında 10.000×g'de 1dk santrifüj edildi.

10. Collection tüp çıkarılıp spin kolon yeni bir collection tüpe konuldu.

11. 500 µl Wash Buffer 1 eklendi.

12. Oda sıcaklığında 10.000×g'de 1dk santrifüj edildi.

13. Collection tüp çıkarılıp spin kolon yeni bir collection tüpe konuldu.

14. 500 µl Wash Buffer 2 eklendi.

15. Oda sıcaklığında maksimum hızda 3dk santrifüj edildi.

16. Collection tüp çıkarıldı.

17. Spin kolon, steril 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.

18. 50 µl Elution Buffer eklendi.

19. Oda sıcaklığında 1dk bekletildi.

20. Oda sıcaklığında maksimum hızda 1dk santrifüj edildi.

21. Spin kolon çıkarılıp, saf DNA mikrosantrifüj tüpünde elde edilmiş oldu.

5.1.4 DNA Sulandırımı ve Konsantrasyon Ölçümü:

İzole edilen DNA'lar "Qubit™ dsDNA BR Assay Kit" (Invitrogen, ABD) ile üretici firmanın talimatnamesine göre Qubit 2.0 florometre cihazında (Invitrogen, ABD) ölçüldü ve stoklardaki DNA miktarları tayin edildi. Elde edilen değerlere göre tüm DNA örneklerinin son konsantrasyonu 5 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı. Böylece PZR ile çoğaltılacak tüm DNA'ların konsantrasyonları eşitlendi.

1. Örnekler ve iki adet standart için 0,5 mL'lik tüpler kullanıldı.

2. Qubit Çalışma Solüsyonu, Broad Range (BR) Reagent'ın 1:200 BR Buffer'da dilüe edilmesiyle hazırlandı.

3. Standart tüplerine 190 µl Çalışma Solüsyonu eklendi.

4. Standart tüplerine sırasıyla 10 µl standart 1 ve 2 konulup, 2-3 saniye vortekslendi.

5. Örnek tüplerine 195 µl Çalışma Solüsyonu ve 5 µl örnek konulup, 2-3 saniye vortekslendi.

6. Hazırlanan tüpler oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.

7. Qubit cihazından dsDNA Broad Range programı seçilip önce standartlar ardından örnekler okutuldu ve ng/µl seçilerek konsantrasyonlar hesaplandı

5.1.5 Multipleks PZR ve Multipleks SBE Panel Primer Dizaynı

MTNR1B geninin 5' komşu bölgesinde bulunan rs1387153 ve rs2166706 ile intron 1 bölgesinde bulunan rs10830963'ü tek bir reaksiyonda çoğaltmak amacıyla yapılan multipleks PZR için primerler tasarlandı. Multipleks PZR primer dizaynı için erişime açık yazılımlar (FastPCR, UCSC In-Silico PCR) kullanıldı. Optimum koşulları sağlamak üzere primerler; bağlanma ısıları 60-80 °C ve uzunlukları 30-32 baz olacak şekilde dizayn edildi. Dizayn edilen primerler ile elde edilecek kalıpların uzunlukları Tablo 1'de verilmiştir. FastPCR 6.6 programında 3 bölgeyi multipleks olarak çalışmak için dizayn edilen olası tüm primerler yukarıda belirtilen şartlar göz önüne alınarak incelendi. Seçilen primerler UCSC In-Silico PCR programında denendi. rs2166706 ve rs10830963 bölgeleri için dizayn edilen bazı primerlerde SNP bölgesi primerin içerisinde kaldığı için amplikon meydana gelmedi ve bu primerler tercih edilmedi. Multipleks PZR için seçilen primerler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Multipleks PZR primerleri ve ürün uzunlukları

	Multipleks PZR Primer Dizileri	**PZR Ürünün Uzunluğu**
rs10830963F	5'-CTTTGTCCAAGGTCACTCTGTCTATGCTGGCA-3'	**323 bp**
rs10830963R	5'-TGGAGGGTAGGGGCTGTGGGCCTATTAAGC-3'	
rs1387153 F	5'-AAGCTCACAAAAGTTACTCCATTTGCCCAAGA-3'	**467 bp**
rs1387153 R	5'-AAACCAATATGAGTGTTGCATTCTGAGGCACT-3'	
rs2166706 F	5'-GGAGGAAGGAGACTAATCAGAGGCTCTTGCA-3'	**376 bp**
rs2166706 R	5'-GAAAACAGTGGGGCATGGATAGGCATCATTGC-3'	

Multipleks SBE panel için kullanılacak SNP tespit (interrogation) primerlerinin dizaynı için erişime açık yazılımlar (BatchPrimer3 v1.0, Multiple Primer Analyzer) kullanıldı. SNP tespit primerleri, PZR kalıplarının 5' ya da 3' yönünde ve hedeflenen polimorfizm nükleotit noktasının bir baz önünde (upstream) kalıba yerleşecek şekilde dizayn edildi. Sonrasında SBE primerlerinin uzunlukları arasında fark oluşturmak için tüm primerlerin 5' ucuna farklı uzunluklarda poliA kuyruğu eklendi. Seçilen SBE primerleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Multipleks SBE primerleri

	Multipleks SBE Panel Primerleri	**bp**
10830963F	5'-A^{16} AGTGATGCTAAGAATTCACACCATCT-3'	**42**
1387153F	5'-A^{21} GTTGCTTTTACAGATAAGAAAATTGAGTT-3'	**50**
2166706F	5'-A^{14} GGTGTGAGGCCATTTGACAG-3'	**34**

5.1.6 Multipleks PZR Reaksiyonu

Stok primerlerden (100nM) belirtilen final konsantrasyonlar da çalışma primerleri hazırlandı. Multipleks PZR reaksiyonu için gerekli komponentler, konsantrasyon ve miktarları Tablo 3'de gösterildiği şekilde uygulanmıştır. DNA polimeraz olarak hot-start özelliği olan "i-StarTaq™ DNA Polymerase" (iNtRON Biotechnology, Korea) kullanıldı. Multipleks PZR reaksiyon ürünleri GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD) termal döngü cihazında Tablo 4'te belirtilen koşullarda tutuldu.

Tablo 3: Multipleks PZR komponentleri

	Stok Konsantrasyonu	Final Konsantrasyonu	1X
dH_2O	---	---	1,4 µl
GC Zengin Buffer	5X	1X	5 µl
$MgCI_2$	25mM	6mM	6µl
dNTPs	100nM	400 µM	1 µl
rs10830963F	100nM	0,5pmol	1 µl
rs10830963R	100nM	0,5pmol	1 µl
rs1387153 F	100nM	5pmol	1 µl
rs1387153 R	100nM	5pmol	1 µl
rs2166706 F	100nM	1,5pmol	1 µl
rs2166706 R	100nM	1,5pmol	1 µl
i-StarTaq DNA Polimeraz	5U	3U	0,6 µl
DNA (25-30ng)	---	---	5 µl
Toplam:	---	---	**25 µl**

Tablo 4: Multipleks PZR koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	15 dk	
Denatürasyon	94 °C	1.30 dk	
Bağlanma	66 °C	1.45 dk	**X36**
Uzama	72 °C	4 dk	
Final Uzaması	72 °C	15 dk	

PZR reaksiyonundan çıkan örnekler, %2'lik "UltraPure™ Agarose" (Invitrogen, ABD) agaroz jelde 1 saat 5 dk yürütüldü. Marker olarak "GeneRuler 100 bp DNA Ladder" (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı.

5.1.7 Multipleks PZR Reaksiyonu Sonrası Pürifikasyon

Multipleks PZR sonrası pürifikasyon için "ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup" (Affymetrix Inc, ABD) kullanıldı. 2 µl PZR ürünü, 2 µl EXOSAP-IT™ ile karıştırıldı ve 37°C de 15 dk tutuldu. Sonrasında enzimi inaktive etmek için 80°C de 15 dk tutuldu. Bu işlem sayesinde multipleks PZR reaksiyonundan kalan ve multipleks SBE reaksiyonunu bozabilecek fazla primerler. dNTP'ler ve tampon

çözeltiler ortamdan uzaklaştırıldı. ExoSAP, ekzonükleaz ve alkalin fosfatazdan oluşan bir pürifikasyon enzim miksidir. Ekzonükleaz aktivitesi ile tek zincirli primerlerin degradasyonu gerçekleştirilmekte, alkalin fosfataz ile nükleotitlerin fosfat gruplarının hidrolizi sağlanmaktadır.

5.1.8 Multipleks SBE Panel

Multipleks SBE panel "GenomeLab™ SNPStart Primer Extension Kit" (BECKMAN COULTER, ABD) ile üretici firmanın talimatnamesine göre yapıldı. Stok primerlerden (100nM) belirtilen final konsantrasyonlar da çalışma primerleri hazırlandı. Multipleks SBE panel için gerekli komponentler, konsantrasyon ve miktarları Tablo 5'te gösterildiği şekilde uygulanmıştır. Devamında hazırlanan örnekler Tablo 6'da belirtilen koşullara göre GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD) termal döngü cihazına konuldu.

Tablo 5: Multipleks SBE komponentleri

	1X
SNP Start Mix	4 µl
dH_2O	2 µl
snap10830963F Primeri (0,5 pmol)	1 µl
snap2166706F Primeri (0,5 pmol)	1 µl
snap1387153F Primeri (1 pmol)	1 µl
PZR Ürünü	1 µl
Toplam:	**10 µl**

Tablo 6: Multipleks SBE koşulları

	Sıcaklık	**Süre**	**Döngü**
Denatürasyon	96 °C	10 sn	
Bağlanma	54 °C	5 sn	**X35**
Uzama	72 °C	30 sn	

5.1.9 Multipleks SBE Panel Sonrası Pürifikasyon

Multipleks SBE panel sonrası pürifikasyon için "Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) " (Affymetrix Inc, ABD) kullanıldı. 10 µl reaksiyon ürünü, 1 µl SAP ile karıştırıldı ve 37°C de 60 dk tutuldu. Sonrasında enzimi inaktive etmek için 80°C de 15 dk tutuldu. Bu işlem sayesinde multipleks SBE reaksiyonundan kalan ve kapiler elektroforez sırasında örneklerin yürümesini bozabilecek fazla dNTPler ve ddNTPler ortamdan uzaklaştırıldı.

5.1.10 Kapiler Elektroforez

Pürifikasyonu yapılan örnekleri kapiler elektroforeze hazırlamak için "CEQ™ Sample Loading Solution (SLS) " (BECKMAN COULTER, ABD), "GenomeLab™ DNA Size Standard Kit - 80BP" (BECKMAN COULTER, ABD) ve "GenomeLab™ Separation Buffer" (BECKMAN COULTER, ABD) kullanıldı. Her örnek için 39,1 µl SLS ile 0,4 µl Size Standart 80 karıştırılıp, vortekslendi ve plate dağıtıldı. Üzerlerine 0,5 µl pürifikasyonu yapılmış örnek eklendi ve bir damla mineral yağ damlatıldı. Ayrıca buffer plağına her örnek için separation buffer konuldu. Hazırlanan örnekler "GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System" (BECKMAN COULTER, ABD) model sekans cihazına yüklendi ve SNP-I metodunda (Tablo 7) yürütüldü.

Tablo 7: SNP-I metodu

Run Method:	**SNP-I**	
Capillary	Temperature	50˚C
	Wait for Temperature	Yes
Denature	Temperature	90˚
	Duration	60 sn
Pause	Duration	0 sn
Injection	Voltage	2 kV
	Duration	30 sn
Seperate	**Stage1**	
	Primary Voltage	6 kV
	Ramp Duration	1 dk
	Stage2	
	Seperation Voltage	6 kV
	Start Time	1 dk
	Ramp Duration	0 dk
Total Seperation Duration		**16 dk**

5.2 Sonuçların Analizi

Elde edilen veriler çalışma formlarına kaydedildi. Daha sonra bu formlardaki veriler nicel ve nitel değerler olarak ikiye ayrılarak istatistiksel analizleri yapıldı. İstatistiksel hesaplamalar Windows işletim sistemi altında çalışan bir bilgisayarda SPSS for Windows 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences INC., Chicago, USA) ve GraphPad InStat 3.05 programları kullanılarak yapıldı.

İkiden fazla grubun kategorik değişkenlerine ait verilerin karşılaştırılmasında "Pearson Chi-Square" testi; ikiden az olanların ise "Fisher Exact Test" kullanıldı.

Tüm bu istatistiksel çalışmalar için p değerinin <0.05 olması anlamlı olarak kabul edildi.

İkiden fazla grubun sürekli değişkenlerine ait verilerin karşılaştırılmasında parameterik dağılım gösterenler “One Way ANOVA” testi; ikiden az olanların ise “Independent Sample T” testi kullanıldı. Nonparametrik ikiden fazla grubun sürekli değişkenlerine ait verilerin karşılaştırılmasında ise “Kruskal Wallis H” testi; ikiden az olanlarında ise “Mann Whitney U” testi kullanıldı. Tüm bu istatistiksel çalışmalar için p değerinin <0.05 olması durumunda sonuçlar anlamlı kabul edildi.

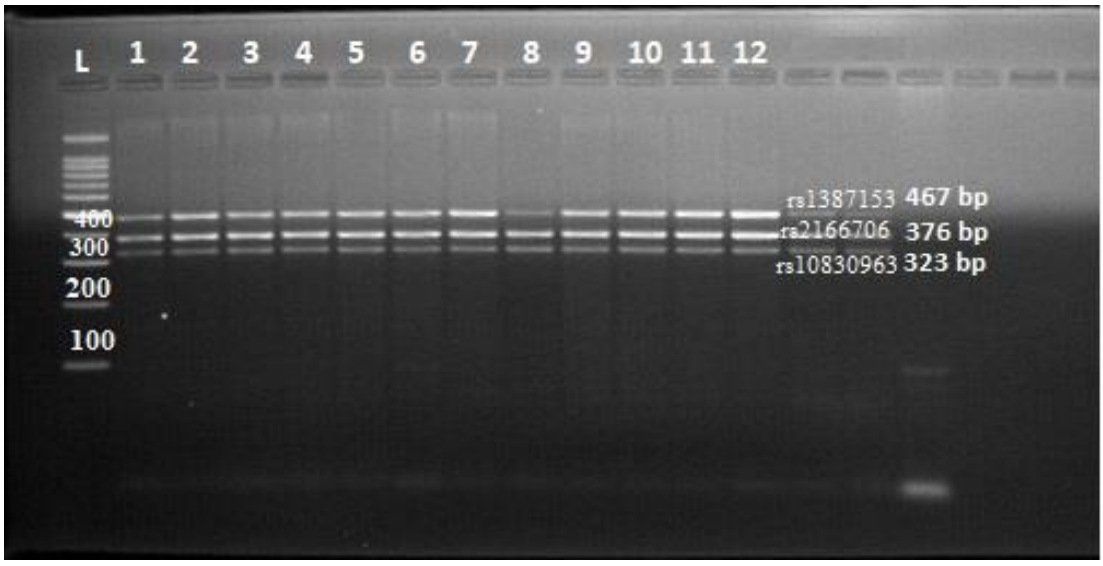
6. BULGULAR

MTNR1B nükleotit polimorfizmleri ile ilgili yapılan çalışmalar T2D ve GDM ile ilişkilendirilmiştir. Literatürde MTNR1B nükleotit polimorfizmleri ve NASH ilişkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda literatürde ilk kez MTNR1B geni nükleotit polimorfizmleri NASH'li hastalar üzerinde çalışıldı. Yine ilk kez literatürde MTNR1B nükleotit polimorfizmları tek bir SBE reaksiyonunda 3-pleks olarak çalışıldı. Çalışma grubunun demografik özellikleri Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8: Çalışma grubunun demografik özellikleri

	NASH (n=100)	**Kontrol (n=100)**	**P Değeri**
Yaş Ortalaması	44.49±8,99	43,54±8,46	P > 0,05
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	50/50	50/50	P > 0,05

Multipleks PZR sonucu elde edilen bantlar Resim 1'de verilmiştir. Multipleks PZR sonrası elde edilen amplikonlar aşağıda verilmiştir (Şekil 6a-c). Tespit primerlerinin bağlandığı bölgelerin altı çizilmiş ve polimorfizmlerin araştırıldığı nükleotitler yıldız ile işaretlenmiştir.

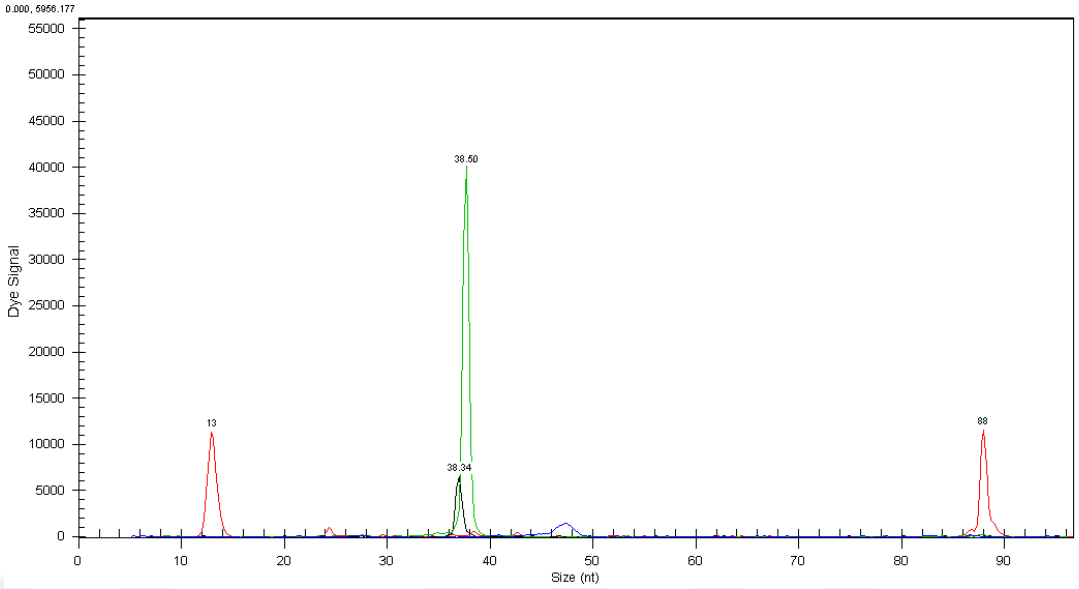


Resim 1: Multipleks PZR Sonrası Jel Görüntüsü (L: Ladder)

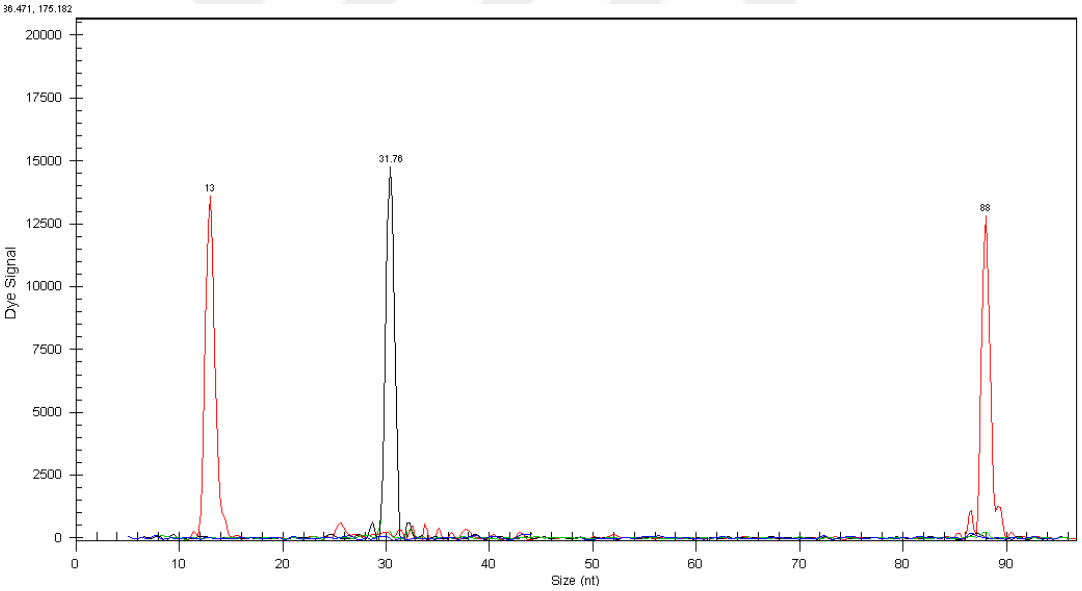


Şekil 6: Multipleks PZRsonrası elde edilen amplikonlar. **6a.**rs10830963 polimorfizmi 323 bp. **6b.**rs2166706 polimorfizmi 376 bp. **6c.**rs1387153 polimorfizmi 467 bp.

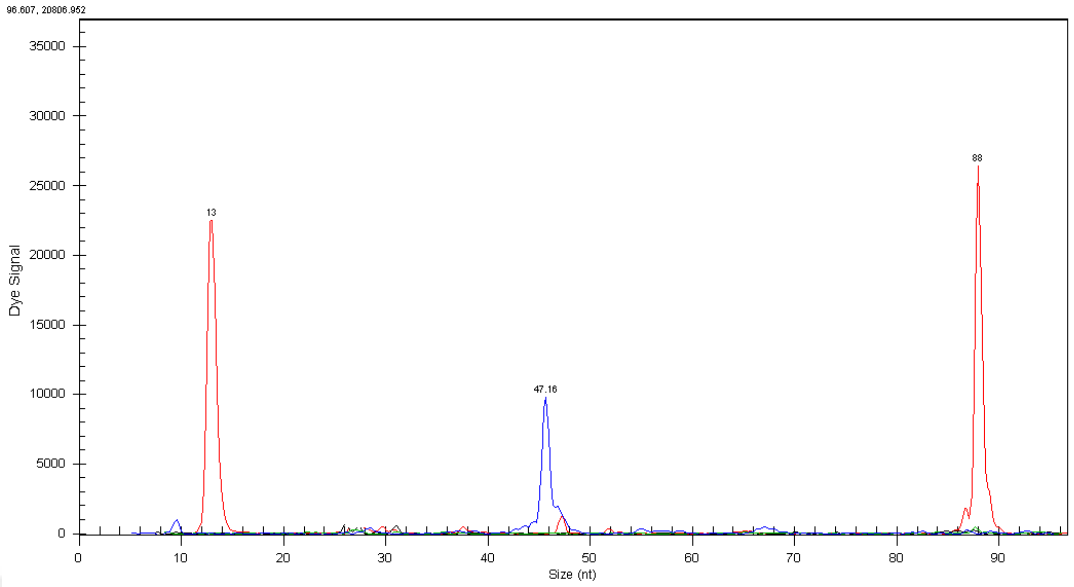
Multipleks SBE reaksiyonundan önce her bir polimorfizm tek tek denenerek tam olarak peak verdikleri noktalar belirlendi. Polimorfizmlerin singlepleks sonuçları aşağıda verilmiştir (Şekil 7, 8 ve 9).



Şekil 7: rs10830963 singlepleks görüntüsü



Şekil 8: rs2166706 singlepleks görüntüsü



Şekil 9: rs1387153 singlepleks görüntüsü

Hasta ve kontrol grupları arasında polimorfizmlere ait genotip frekanslarını karşılaştırmadan önce kontrol grubunun Hardy-Weinberg Eşitliğine (HWE) göre dengede olup olmadığı test edildi (Tablo 9,10 ve 11).

Tablo 9: Kontrol grubundaki rs10830963 polimorfizmi için HWE test sonuçları

rs10830963 Genotip Frekanslar	**Gözlenen**	**Beklenen**
Homozigot Majör Allel	42	39,7
Heterozigot	42	46,6
Homozigot Minör Allel	16	13,7
Minör Allel Frekansı	0,37	100
Ki-kare Değeri	0,982063144	
Ki-kare Test P Değeri	**0,321690**	
Sonuç:	HWE ile uyumlu	

Tablo 10: Kontrol grubundaki rs13837153 polimorfizmi için HWE test sonuçları

rs13837153 Genotip Frekanslar	**Gözlenen**	**Beklenen**
Homozigot Majör Allel	52	48,3
Heterozigot	35	42,4
Homozigot Minör Allel	13	9,3
Minör Allel Frekansı	0,305	100
Ki-kare Değeri	3,042615529	
Ki-kare Test P Değeri	**0,081105**	
Sonuç:	HWE ile uyumlu	

Tablo 11: Kontrol grubundaki rs2166706 polimorfizmi için HWE test sonuçları

rs2166706 Genotip Frekanslar	**Gözlenen**	**Beklenen**
Homozigot Majör Allel	17	19,4
Heterozigot	54	49,3
Homozigot Minör Allel	29	31,4
Minör Allel Frekansı	0,44	100
Ki-kare Değeri	0,917365913	
Ki-kare Test P Değeri	**0,338168**	
Sonuç:	HWE ile uyumlu	

Multipleks SBE reaksiyonu sonuçlarına göre hasta ve kontrol grubunda rs10830963 polimorfizmi için majör allel C olarak saptandı ve çalışmamızda Türk populasyonunda majör C allelinin frekansı hasta grubunda %66,5 bulunurken, kontrol grubunda %63 bulundu. rs1387153 polimorfizmi için majör allel C olarak

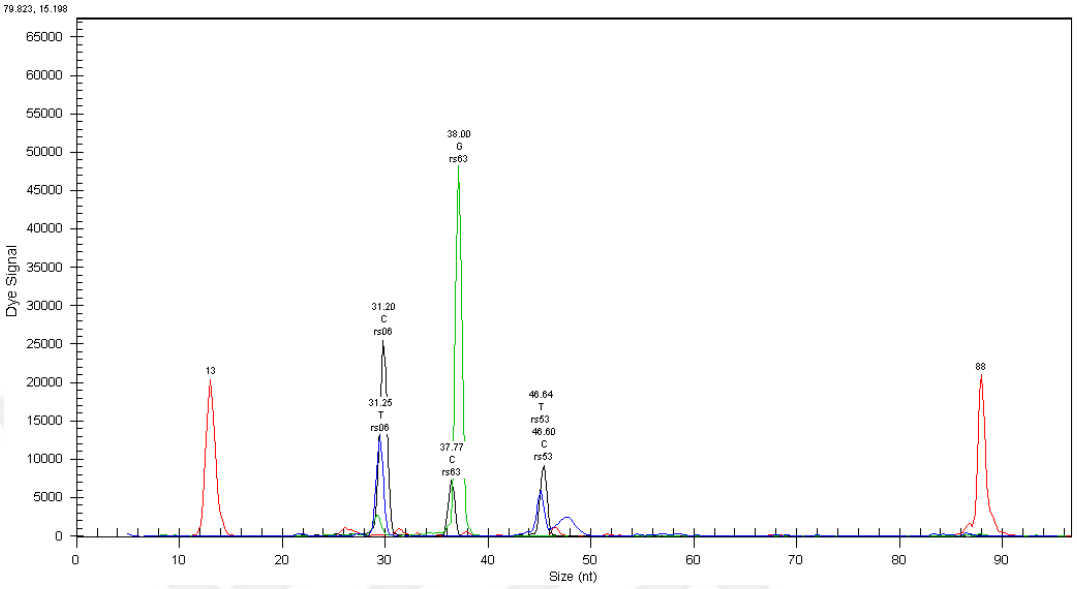
saptandı ve çalışmamızda Türk populasyonunda majör C allelinin frekansı hasta grubunda %72 bulunurken, kontrol grubunda %69,5 bulundu. rs2166706 polimorfizmi için ise majör allel T olarak saptandı ve çalışmamızda Türk populasyonunda majör T allelinin frekansı hasta grubunda %59,5 bulunurken, kontrol grubunda ise %56 bulundu. Polimorfizmlere ait allel ve genotip frekansları Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12: Polimorfizmlerin hasta ve kontrol grubunda dağılımı

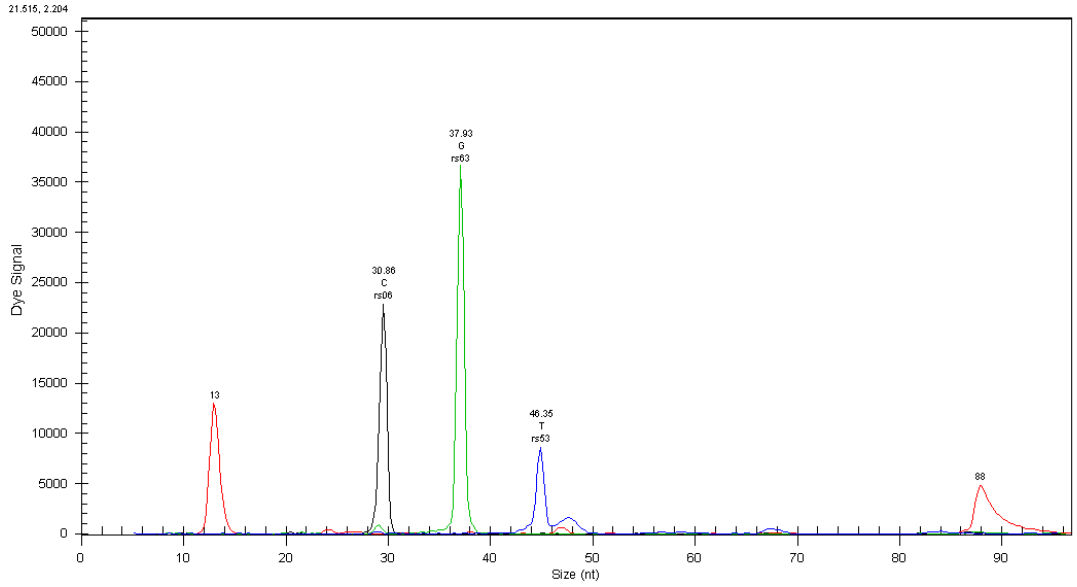
	Hasta	**Kontrol**	
rs10830963 (C/G)	**n (%)**	**n (%)**	**P Değeri***
CC	48(%48)	42(%42)	0,68
CG	37(%37)	42(%42)	
GG	15(%15)	16(%16)	
Allel Frekansı	**n (%)**	**n (%)**	**P Değeri***
C Alleli	133(%66,5)	126(%63)	0,53
G Alleli	67(%33,5)	74(%37)	
rs1387153 (C/T)	**n (%)**	**n (%)**	**P Değeri***
CC	54(%54)	52(%52)	0,80
CT	36(%36)	35(%35)	
TT	10(%10)	13(%13)	
Allel Frekansı	**n (%)**	**n (%)**	**P Değeri***
C Alleli	144(%72)	139(%69,5)	0,66
T Alleli	56(%28)	61(%30,5)	
rs2166706 (C/T)	**n (%)**	**n (%)**	**P Değeri***
CC	18(%18)	17(%17)	0,40
CT	45(%45)	54(%54)	
TT	37(%37)	29(%29)	
Allel Frekansı	**n (%)**	**n (%)**	**P Değeri***
C Alleli	81(%40,5)	88(%44)	0,54
T Alleli	119(%59,5)	112(%56)	

*Fisher's Ki-kare teste ait P değerleri.

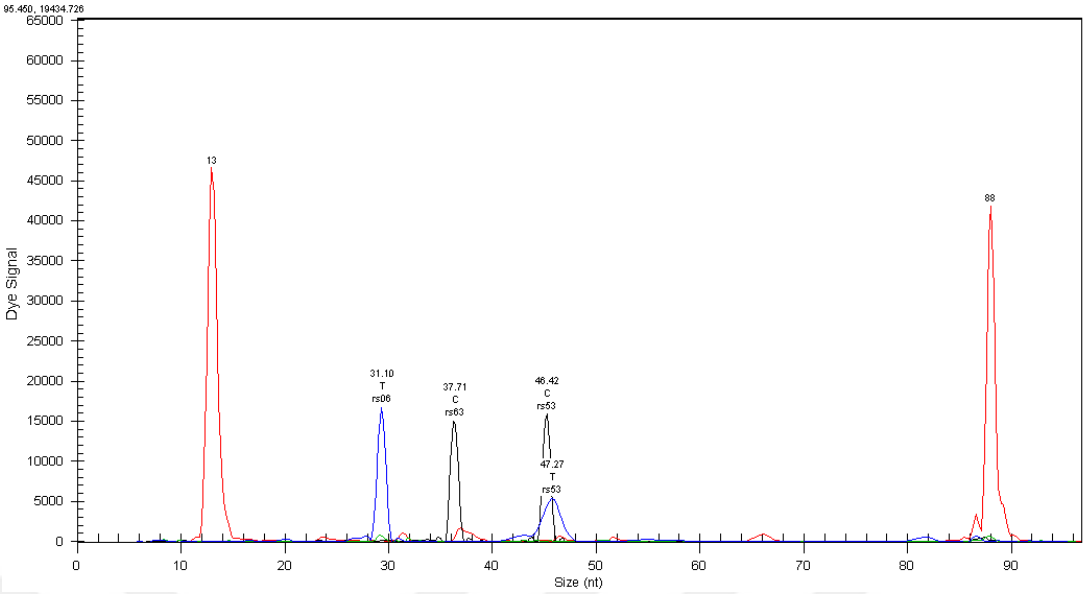
Çalışma grubuna ait SBE panel görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 10, 11 ve 12).



Şekil 10: Heterozigot rs2166706, rs10830963 ve rs1387153 peakleri



Şekil 11: Homozigot rs2166706, rs10830963 ve rs1387153 peakleri



Şekil 12: Homozigot rs2166706, rs10830963 ve heterozigot rs1387153 peakleri

7. TARTIŞMA

Çalışmamızda NASH ile MTNR1B polimorfizmlerinin [rs10830963 (C/G), rs1387153 (C/T), ve rs2166706 (C/T)] olası potansiyel ilişkisini araştırdık. Bizi bu araştırmaya yönlendiren araştırdığımız MTNR1B polimorfizmlerinin insülin salınımını azaltmış olmasıdır. Nitekim NAFLD gelişiminde benzer bir etkiye sahip insülin direnci hepatositlerde yağ birikimini artırarak hastalığa yol açmaktadır. Bu aşamada MTNR1B polimorfizmlerinin bu etkiye katkı sağlayarak hastalığın patogenezine dahil olabileceğini düşündük. Bu amaçla çalışmamıza yaş ve cinsiyet eşleştirilmiş 100 NASH'li ve 100 kontrol birey dahil edilmiştir. Literatürde ilk kez rs10830963 (C/G), rs1387153 (C/T), ve rs2166706 (C/T) polimorfizmlerini tek bir reaksiyonda tayin etmek için mültipleks SBE yöntemi geliştirilmiştir. Literatürde ilk kez Türk populasyonunda bu polimorfizmlere ait genotip ve allel frekansları belirlenmiş olup hasta ve kontrol grupları arasında MTNR1B polimorfizmlerine allel ve genotip frekansları arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır. Ayrıca yapılan alt grup analizinde bu polimorfizmlerin T2D ile de ilişki bulunamamıştır. Ancak literatürde NASH ve MTNR1B ilişkisi ilk kez araştırılmış olduğundan elde ettiğimiz bu sonuç etraflıca irdelenmelidir.

Türk populasyonu için rs10830963 (C/G) polimorfizmine ait minör allel G olarak belirlenmiş olup kontrol grubunda frekansı %37 iken, hasta grubunda %33,5'tir. rs10830963 polimorfizmi ile ilgili yapılan diğer çalışmalar incelediğinde G allelinin minör allel olarak saptandığı ve genellikle T2D ve GDM ile ilişkilendirildiği gözlenmiştir. Bu nedenle "G" allelinin T2D ve GDM için bir risk alleli olduğu bildirilmektedir (Chambers ve ark., 2009). Bununla birlikte elde ettiğimiz bulgulara benzer şekilde; araştırılan hastalıkla ilişki bildirmeyen benzer çalışmalarda mevcuttur; Güney Hint populasyonuna ait G allel frekansı kontrol grubunda %43 iken, T2D grubunda %41,9 olarak (P=0,693) saptanmış olup T2D ile herhangi bir bağlantı gösterilememiştir (Salman ve ark., 2015). Ancak T2D ile doğrudan ilişki saptanmadığı halde alt grup analizlerinde G allelinin açlık glikoz ve beta hücre fonksiyonları ile bağlantılı olduğunu bildiren çalışmalarda mevcuttur. Bosna Hersek'te T2D'li bireylerde yapılan çalışmada G allel frekansı kontrol grubunda %30, T2D grubunda %23 olarak rapor edilmiştir "G" allelinin sadece

artmış açlık glikoz seviyesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Semiz ve ark., 2014). Yine Japonlarda 3 farklı çalışma grubunda T2D ile rs10830963 polimorfizmi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Kontrol gruplarında da G allel frekansı %40,3, %43,3 ve %40,6 olarak tespit edilmiştir. T2D grubunda ise %42,6, %44,4 ve %43,8 olarak bulunmuştur. G alleli yine sadece β hücre fonksiyonunu azalması ve açlık glikoz seviyesini yüksekliği ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Ohshige ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalara bakıldığında rs10830963 polimorfizminin GDM ile olan ilişkisinin T2D'e göre çok daha güçlü olduğu görülmektedir. Nitekim Yunan, Rus, Finlandiya, Brezilya, Polonya, Kore ve Han Çin gibi birçok populasyonda GDM için risk alleli aynı zamanda minör allel olan G alleli olarak saptanmıştır. Bu çalışmalarda kontrol gruplarına ait G allel frekansları sırasıyla; %27,55, %28,8, %35, %20,2, %31,2, %45,3 ve %39,3 iken GDM gruplarında frekanslar sırasıyla; %40,91, %41,5, %47, %27,6, %39,2, %52,1 ve %51,2 olarak bildirilmiştir (Vlassi ve ark., 2012; Popova ve ark., 2017; Huopio ve ark., 2013; Alberton ve ark., 2015; Tarnowski ve ark., 2016; Kim ve ark., 2011; Li ve ark., 2018). Bununla birlikte ilişki bulunamayan çalışmalarda mevcuttur. Bunlardan biri Çin populasyonunda yapılmış olan çalışmadır. G allel frekansı kontrol grubunda %43,3 iken GDM grubunda %45,6 bulunmuştur ancak alt grup analizinde β hücre fonksiyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2011).

rs10830963 polimorfizminin, NASH gelişimine katkı sağlama ihtimali yüksek olan T2D ve GDM ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmaların yanı sıra Graves' hastalığı, skolyoz ve hepatoselüler karsinoma (HCC) gibi hastalıkların patogenezinde de rol oynayabileceği hipotezine dayanılarak yapılan araştırmalarda herhangi bir bağlantı saptanmamıştır. Yapılan çalışmalarda kontrol gruplarında G alleline ait frekanslar sırasıyla; %43,3, %26,7 ve %44,4 iken hasta gruplarında frekanslar sırasıyla; %46,4, %26,1 ve %45,1 olarak rapor edilmiştir (Lin ve ark., 2017; Nelson ve ark., 2010; Su ve ark., 2017).

Türk populasyonunda rs1387153 (C/T) için minör allel T olarak belirlenmiş olup kontrol grubunda frekansı %30,5 iken, hasta grubunda %28'tir. Literatür tarandığında rs1387153 polimorfizminin GDM ile olan ilişkisinin rs10830963'tekine

benzer şekilde T2D'e göre daha güçlü olduğu görülmektedir. Yunan, Rus, Finlandiya ve Kore populasyonlarında hasta grubunda T allelinin GDM için risk alleli olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmalarda kontrol gruplarına ait T allel frekansları sırasıyla; %29,08, %27, %36 ve %44,4 iken GDM gruplarında frekanslar sırasıyla; %32,47, %39, %44 ve %50,3 olarak tespit edilmiştir (Vlassi ve ark., 2012; Popova ve ark., 2017; Huopio ve ark., 2013; Kim ve ark.,). GDM'nin aksine rs1387153 polimorfizminin T2D için risk oluşturmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Güney Hint populasyonunda T allel frekansı kontrol grubunda %38 iken, T2D grubunda %36,3 (P=0,513) bulunmuştur (Salman ve ark., 2015). Japonlarda 3 farklı çalışmaya ait kontrol grubunda ise T allel frekansı %38,7, %41 ve %38,2 olarak tespit edilmiştir. T2D grubunda ise %40,6, %41,4 ve %41,6 olarak bulunmuştur. Anlamlı bir fark elde edilememesine rağmen T allelinin β hücre fonksiyonunu azalttığı ve açlık glikoz seviyesini yükselttiği rapor edilmiştir (Ohshige ve ark., 2011).

rs1387153 polimorfizmi de, Graves' hastalığı ve hepatoselüler karsinomada (HCC) analiz edilmiştir. Yapılan çalışmalarda kontrol gruplarında T alleline ait frekanslar sırasıyla; %44,7 ve %46,3 iken hasta gruplarında ise sırasıyla; %43,3 ve %46,9 olarak tespit edilmiş olup hastalık patogenezlerinde rol oynamadığı bildirilmiştir (Lin ve ark., 2017; Su ve ark., 2017).

Türk populasyonunda rs2166706 (C/T) için minör allel C olarak belirlenmiş olup kontrol grubunda frekansı %44 iken, hasta grubunda %40,5'tir. rs2166706 polimorfizmi ile ilgili yapılan diğer çalışmalara bakıldığında genellikle T2D riskiyle ilişkilendirilmiştir ve yatkınlık alleli olarak C tespit edilmiştir (Chambers ve ark., 2009). Ancak bu ilişki diğer polimorfizmler kadar incelenmemiştir ve negatif çalışmalar da literatürde mevcuttur. Güney Hint populasyonunda C allel frekansı kontrol grubunda %47,5 iken, T2D grubunda %49,6 (P=0,445) bulunmuştur ve C allel frekanslarının hasta ile kontrol grupları arasında anlamlı bir farka sahip olmadığı görülmüştür (Salman ve ark., 2015).

Yapılan çalışmalar analiz edildiğinde allel frekanslarının çalışmamız ile uyumlu olduğunu gördük. Üç polimorfizm arasından T2D ve GDM riski açısından en güçlü ilişkinin rs10830963 polimorfizmine ait olduğu görülmektedir. T2D, NASH'in bir komponenti olmasına rağmen T2D ve GDM riskini artıran MTNR1B polimorfizmlerinin NASH ile ilişkisi bulunamamıştır. Her ne kadar T2D, NASH'in komponentleri arasında yer alsa da NASH hastalarının neredeyse yarısında bu hastalık görülmemektedir. Ayrıca T2D ve NASH'in gelişiminde etkili yolakların ve bu yolaklardaki genetik değişikliklerin hastalıklara özgün olarak farklı etkilere sahip olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Literatürde T2D ile ilişki saptanmayan önemli sayıda çalışmanın mevcudiyeti de bu tezi desteklemektedir. Polimorfizmlere ait bildirilen risk allelinin coğrafik ve etnik olarak farklılık gösterdiği de bir gerçektir. Bu durum mevcut yatkınlığı işaret etmesi açısından belli populasyonlarda ilişkiyi maskeleyici de olabilir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar dünyadaki polimorfizmlerin ortalamasına denk düşmektedir. rs10830963 ve rs1387153 polimorfizmi için allel frekanslarına bakıldığında dünya genelinde frekansların batıdan doğuya doğru artığı görülmektedir. Ancak rs2166706 için değişik coğrafik gruplarda yapılmış çok fazla çalışma olmadığı için allel frekansını coğrafik açıdan irdelemek mümkün değildir.

Polimorfizme ait olan allelerin frekanslarının nispeten birbirine yakın olması ve yüksek seyretmesi istatiksel herhangi bir analizin yapılmasını engellememiştir (Tablo 12). Bu nedenle çalışmamız güç analizi açısından kısıtlayıcı gözükmemektedir. Ancak doğal olarak polimorfizm çalışmalarında yüksek sayılar elbetteki sonucun tekrarlanabilirliğini artırmaktadır. Bazen ilişki gen ile olduğunda farklı populasyonlarda aynı gene ait farklı lokuslar yatkınlık kazandırmaktadır. Çalışmamızda MTNR1B'ye ait sadece 3 polimorfizme bakılmış olması nedeniyle MTNR1B'nin net bir şekilde NAFLD ile ilişkisiz olduğu söylenemez. Gene ait diğer varyantların analizinin de yapılması gerekmektedir.

Geliştirdiğimiz mültipleks SBE yöntemi ile literatürde ilk kez MTNR1B bölgesine ait 3 farklı polimorfizm tek bir reaksiyonda tespit edildi. Bu 3 polimorfizme Sanger sekanslama ile tek tek bakılması hem maliyet açısından hem de zaman açısından etkin olmadığı için geliştirdiğimiz yöntem daha geniş çalışma

gruplarında bu polimorfizmlerin taranması için büyük kolaylık sağlayacaktır. Ayrıca bizim araştırdığımız polimorfizmler dışında MTNR1B genine ait başka polimorfizmlerde mevcuttur(Chambers ve ark., 2009). Multipleks SBE yöntemi 10 polimorfizmi tek bir reaksiyonda tayin edebilen bir yöntemdir. Bu nedenle bizim araştırdığımız polimorfizmlere ek olarak prevelan olan diğer MTNR1B polimorfizmleri daha geniş NASH gruplarında analiz edilmelidir. Bir başka seçenekte MTNR1B geninin tamamının sekanslanmasıdır.

Tüm bunların dışında genin ekspresyonunu azaltan ve artıran metilasyon paternlerine bakılabilir. Gen ekspresyonu analizi açısından in vivo ve in vitro NASH modellerinde MTNR1B geni knock-out veya over eksprese edilerek hastalık gelişimi üzerine olası etkileri araştırılabilir.

Sonuç olarak MTNR1B ve NASH arasında yapılan ilk çalışma sonuçlarına göre araştırmış olduğumuz polimorfizmlerin hastalık ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca Türk populasyonunda daha önce MTNR1B polimorfizmleri ile ilgili yapılmış başka bir çalışma da yoktur. Bu nedenle elde edilen bu frekanslar Türk populasyonunda T2D ve GDM başta olmak üzere yapılacak diğer çalışmalar için önemli bir kaynak oluşturmaktadır.

8. KAYNAKLAR

1. Arıkoğlu H, Erkoç Kaya D. Tip 2 diyabetin moleküler genetik temeli; Son gelişmeler. Genel Tıp Derg. 2015;25: 147-159.

2. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. World J Hepatol. 2017; 9(16): 715-732.

3. Boğa S. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığında Hemojuvelin ve Hepsidinin Önemi. ŞHEEAH Gastroenteroloji Kliniği, Yan Dal Uzmanlık Tezi, 2014, İstanbul (Danışman: Doç. Dr. C Alataş Alkım).

4. Bonnefond A, Froguel P. Disentangling the Role of Melatonin and its Receptor MTNR1B in Type 2 Diabetes: Still a Long Way to Go? Curr Diab Rep. 2017;17: 122.

5. Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proença C, Sparsø T, Holmkvist J, Marchand M, Delplanque J, Lobbens S, Rocheleau G, Durand E, De Graeve F, Chèvre JC, Borch-Johnsen K, Hartikainen AL, Ruokonen A, Tichet J, Marre M, Weill J, Heude B, Tauber M, Lemaire K, Schuit F, Elliott P, Jørgensen T, Charpentier G, Hadjadj S, Cauchi S, Vaxillaire M, Sladek R, Visvikis-Siest S, Balkau B, Lévy-Marchal C, Pattou F, Meyre D, Blakemore AI, Jarvelin MR, Walley AJ, Hansen T, Dina C, Pedersen O, Froguel P. A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. Nat Genet. 2009;41(1): 89-94.

6. Chambers JC, Zhang W, Zabaneh D, Sehmi J, Jain P, McCarthy MI, Froguel P, Ruokonen A, Balding D, Jarvelin MR, Scott J, Elliott P, Kooner JS. Common genetic variation near melatonin receptor MTNR1B contributes to raised plasma glucose and increased risk of type 2 diabetes among Indian Asians and European Caucasians. Diabetes. 2009;58(11): 2703-8.

7. Chang SW, Gong Y, McDonough CW, Langaee TY, Nasiri Kenari N, Beitelshees AL, Gums JG, Chapman AB, Turner ST, Johnson JA, Cooper-DeHoff RM1.

Melatonin Pathway and Atenolol-Related Glucose Dysregulation: Is There a Correlation? Clin Transl Sci. 2016;9: 114–122.

8. Doi Y, Yamamoto Y, Inagaki S, Shigeta Y, Miyaishi S, Ishizu H. A new method for ABO genotyping using a multiplex single-base primer extension reaction and its application to forensic casework samples. Leg Med. 2004;6(4): 213-23.

9. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. Biomed Pharmacother. 2006;60: 97–108.

10. Emet M, Ozcan H, Ozel L, Yayla M, Halici Z, Hacimuftuoglu A. A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. Eurasian J Med. 2016; 48: 135-41.

11. Engin A. Obesity and Lipotoxicity. In: Engin AB, Engin A, eds. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing; 2017, p:443-467.

12. Garaulet M, Gómez-Abellán P, Rubio-Sastre P, Madrid JA, Saxena R, Scheer FA. Common type 2 diabetes-risk variant in MTNR1B worsens the deleterious effect of melatonin on glucose tolerance in humans. Metabolism. 2015;64(12): 1650–1657.

13. Huopio H, Cederberg H, Vangipurapu J, Hakkarainen H, Pääkkönen M, Kuulasmaa T, Heinonen S, Laakso M. Association of risk variants for type 2 diabetes and hyperglycemia with gestational diabetes. Eur J Endocrinol. 2013;169: 291-7.

14. Junior JP, Frigeri HR, Dos Santos-Weiss IC, de Souza EM, Rego FG, Picheth G, Alberton D. The MTNR1B gene polymorphism rs10830963 is associated with gestational diabetes in a Brazilian population. Gene. 2015;568: 114-5.

15. Kim JY, Cheong HS, Park BL, Baik SH, Park S, Lee SW, Kim MH, Chung JH, Choi JS, Kim MY, Yang JH, Cho DH, Shin HD, Kim SH. Melatonin receptor 1 B polymorphisms associated with the risk of gestational diabetes mellitus. BMC Med Genet. 2011;12: 82.

16. Li C, Qiao B, Zhan Y, Peng W, Chen ZJ, Sun L, Zhang J, Zhao L, Gao Q. Association between genetic variations in MTNR1A and MTNR1B genes and

gestational diabetes mellitus in Han Chinese women. Gynecol Obstet Invest. 2013;76: 221-7.

17. Li C, Zhou Y, Qiao B, Xu L, Li Y, Li C. Association Between a Melatonin Receptor 1B Genetic Polymorphism and Its Protein Expression in Gestational Diabetes Mellitus. Reprod Sci. 2018:1933719118765983.

18. Lin JD, Yang SF, Wang YH, Fang WF, Lin YC, Liou BC, Lin YF1, Tang KT, Cheng CW. Associations of melatonin receptor gene polymorphisms with Graves' disease. PLoS One. 2017;12: e0185529.

19. Mulder H. Melatonin signalling and type 2 diabetes risk: too little, too much or just right? Diabetologia. 2017;60: 826–829.

20. Mulder H, Nagorny CL, Lyssenko V, Groop L**.** Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. Diabetologia. 2009;52(7): 1240-9.

21. Müssig K, Staiger H, Machicao F, Häring HU, Fritsche A. Genetic variants in MTNR1B affecting insulin secretion. Ann Med. 2010;42: 387–393.

22. Nelson LM, Ward K, Ogilvie JW. Genetic variants in melatonin synthesis and signaling pathway are not associated with adolescent idiopathic scoliosis. Spine (Phila Pa 1976). 2011;36: 37-40.

23. Ohshige T, Iwata M, Omori S, Tanaka Y, Hirose H, Kaku K, Maegawa H, Watada H, Kashiwagi A, Kawamori R, Tobe K, Kadowaki T, Nakamura Y, Maeda S. Association of new loci identified in European genome-wide association studies with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese. PLoS One. 2011;6: e26911.

24. Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. J Hepatol. 2005;42: 928–940.

25. Pirola CJ, Gianotti TF, Burgueño AL, Rey-Funes M, Loidl CF, Mallardi P, Martino JS, Castaño GO, Sookoian S. Epigenetic modification of liver mitochondrial

DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2013;62(9): 1356-63.

26. Polina V. Popova, Alexandra A. Klyushina, Lyudmila B. Vasilyeva, Alexandra S. Tkachuk, Yana A. Bolotko, Andrey S. Gerasimov, Evgenii A. Pustozerov, Ekaterina N. Kravchuk, Alexander Predeus, Anna A. Kostareva, Elena N. Grineva. Effect of gene-lifestyle interaction on gestational diabetes risk. Oncotarget. 2017;8: 112024–112035.

27. Reccia I, Kumar J, Akladios C, Virdis F, Pai M, Habib N, Spalding D. Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. Metabolism. 2017;72: 94-108.

28. Salman M, Dasgupta S, Cholendra A, Venugopal PN, Lakshmi GL, Xaviour D, Rao J, D'Souza CJ. MTNR1B gene polymorphisms and susceptibility to Type 2 Diabetes: A pilot study in South Indians. Gene. 2015;566: 189-93.

29. Sharma S, Singh H, Ahmad N, Mishra P, Tiwari A. The role of melatonin in diabetes: therapeutic implications. Arch Endocrinol Metab. 2015;59(5): 391-9.

30. Semiz S, Dujic T1, Velija-Asimi Z, Prnjavorac B, Bego T, Ostanek B, Marc J, Causevic A. Effects of melatonin receptor 1B gene variation on glucose control in population from Bosnia and Herzegovina. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2014;122: 350-5.

31. Shih-Chi Su, Yung-Chuan Ho, Yu-Fan Liu, Russel J. Reiter, Chia-Hsuan Chou, Chia-Ming Yeh, Hsiang-Lin Lee, Wen-Hung Chung, Ming-Ju Hsieh, Shun-Fa Yang. Association of melatonin membrane receptor 1A/1B gene polymorphisms with the occurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. Oncotarget. 2017;8: 85655–85669.

32. Tarnowski M, Malinowski D, Safranow K, Dziedziejko V, Pawlik A. MTNR1A and MTNR1B gene polymorphisms in women with gestational diabetes. Gynecol Endocrinol. 2017;33: 395-398.

33. Vlassi M, Gazouli M, Paltoglou G, Christopoulos P, Florentin L, Kassi G, Mastorakos G. The rs10830963 variant of melatonin receptor MTNR1B is associated with increased risk for gestational diabetes mellitus in a Greek population. Hormones (Athens). 2012;11: 70-6.

34. Zhang , Sun C, Hu X, Zhao Y. Relationship between melatonin receptor 1B and insulin receptor substrate 1 polymorphisms with gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. Journal List Scientific Reports. 2014;4: 1-7.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	DEMET	**Soyadı**	YILMAZ
Doğum Yeri	KADIKÖY	**Doğum Tarihi**	24.09.1993
Uyruğu	TC	**Tel**	0532 161 43 18
E-mail	yilmz.demet@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	MARMARA ÜNİVERSİTESİ	2015
Lise	ASİYE AĞAOĞLU ÇOK PROGRAMLI LİSESİ	2011

İş Deneyimi

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İNGİLİZCE	ORTA	ORTA	ORTA

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	71,250							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	77,14817	79,46221	73,39726
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

EK :

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	**PROTOKOL KODU**	**09.2017.717**
	PROJE ADI	MTNR1B geni nükleotit varyasyonlarının Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı etyopatogenezi ile ilişkisi
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Doç. Dr. Fatih EREN

KARAR BİLGİLERİ	Tarih 03.11.2017 **Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.**

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof.Dr. Haner DİRESKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Prof. Dr. Şefik GÖRKEY	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Prof.Dr. Atila KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	□ EVET ▪ HAYIR	
Prof.Dr. Semra SARDAŞ	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Prof. Dr. Beste Melek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Doç. Dr. Elif KARAKOÇ AYDINER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Doç.Dr: Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	
Gözde Aynur MİRZA	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	▪ Var ▪ Yok	□ Evet ▪ Hayır	