



**TİP 2 DİYABETLİ HASTALARDA *NİKOTİNAMİD FOSFORİBOZİL  
TRANSFERAZ (NAMPT)*, *İNTERLÖKİN-6 (IL-6)* VE *VASPIN*'İN GEN  
POLİMORFİZMLERİ**

**Damla Nur PARILTI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AĞUSTOS 2022**

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Damla Nur PARILTI

03/08/2022

TİP 2 DİYABETLİ HASTALARDA *NİKOTİNAMİD FOSFORİBOZİL TRANSFERAZ*  
(*NAMPT*), *İTERLÖKİN-6 (IL-6)* VE *VASPIN*'İN GEN POLİMORFİZMLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Damla Nur PARILTI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2022

ÖZET

Tip 2 diyabet (T2DM) dünya genelindeki en yaygın metabolik hastalıklardan biridir. Tip 2 diyabet, pankreas  $\beta$  hücrelerinin insülin sekresyonunun yeterli düzeyde olmaması, insülinin hedef organlardaki etkisinin azalması (insülin direnci) veya her ikisinin etkisinden de kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize bir hastalıktır. Tip 2 diyabet hastalarında hipergliseminin şiddetine ve süresine bağlı olarak mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar gelişmektedir. Tip 2 diyabetin gelişimindeki genetik risk faktörleri karmaşıktır. Çalışmamızda, 10 yıldır tip 2 diyabet hastası olan 120 birey komplikasyonu bulunmayan hasta grubu, mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubu ve makrovasküler komplikasyonlu hasta grubu olmak üzere üç ayrı grupta incelenmiştir ve kontrol grubunda ise hasta grupları ile uyumlu 40 sağlıklı gönüllü birey bulunmaktadır. Sitokin kodlayan genler olan *NAMPT*, *IL-6* ve *Vaspin* genlerinin tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) ve LightSNiP Assay ile gerçekleştirilen Real-Time PCR (qPCR) yöntemi ile incelenmiştir. *NAMPT* geni için rs61330082 ve rs2058539 SNP'leri, *IL-6* geni için rs2069860 ve rs1554606 SNP'leri ve *Vaspin* geni için rs77060950 ve rs2236242 SNP'leri incelenmiştir. Bu genlerin tip 2 diyabet ile ilişkisinin bulunması hastalığın teşhisinde markör olarak kullanılma potansiyeli açısından önemlidir.

Bilim Kodu : 20326  
Anahtar Kelimeler : Tip 2 diyabet, Polimorfizm, *NAMPT*, *IL-6*, *Vaspin*, SNP  
Sayfa Adedi : 114  
Danışman : Prof. Dr. Leyla AÇIK

THE GENE POLYMORPHISMS OF NICOTINAMIDE  
PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (NAMPT), INTERLEUKIN-6 (IL-6) AND  
VASPIN IN TYPE 2 DIABETES PATIENTS

(M. Sc. Thesis)

Damla Nur PARILTI

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2022

ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2DM) is one of the most common metabolic diseases in the world. Type 2 diabetes is a disease characterized by hyperglycemia caused by insufficient secretion of insulin by pancreatic  $\beta$  cells, decreased effect of insulin in target organs (insulin resistance), or both. Microvascular and macrovascular complications develop in type 2 diabetes patients depending on the severity and duration of hyperglycemia. The genetic risk factors for the development of type 2 diabetes are complex. In our study, 120 individuals with type 2 diabetes for 10 years were examined in three different groups: the patient group without complications, the patient group with microvascular complications, and the patient group with macrovascular complications, also the control group included 40 healthy volunteers who were compatible with the patient groups. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of cytokine encoding genes *NAMPT*, *IL-6* and *Vaspin* were investigated by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and Real-Time PCR (qPCR) method performed with LightSNiP Assay. The rs61330082 and rs2058539 SNPs for the *NAMPT* gene, the rs2069860 and rs1554606 SNPs for the *IL-6* gene, and the rs77060950 and rs2236242 SNPs for the *Vaspin* gene were examined. The association of these genes with type 2 diabetes is important in terms of their potential to be used as markers in the diagnosis of the disease.

Science Code : 20326

Key Words : Type 2 diabetes, Polymorphism, *NAMPT*, *IL-6*, *Vaspin*, SNP

Page Number : 114

Supervisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince beni bilgisi, tecrübesi ve önerileriyle yönlendiren ve her zaman destek olan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Leyla AÇIK’a, çalışmanın klinik aşamasında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. İlhan YETKİN ve Doç. Dr. Mehmet Muhittin YALÇIN’a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım boyunca hep yanımda olan ve destekleyen Süheyla Pınar ÇELİK, İlayda Sezin YALÇINKAYA ve Leyla ARSLAN başta olmak üzere Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarındaki asistanlarımız ve ekip arkadaşlarıma, hayatımın her anında bana destek olan, sevgi ve emekle beni bugünlere getiren biricik aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışma “Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi” tarafından 05/2020-03 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

|                                                 | Sayfa |
|-------------------------------------------------|-------|
| ÖZET.....                                       | iv    |
| ABSTRACT.....                                   | v     |
| TEŞEKKÜR.....                                   | vi    |
| İÇİNDEKİLER .....                               | vii   |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                       | x     |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....                         | xii   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                    | xvi   |
| 1. GİRİŞ.....                                   | 1     |
| 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI..... | 3     |
| 2.1. Diabetes Mellitus (Diyabet) .....          | 3     |
| 2.1.1. Diyabet sınıflandırması .....            | 3     |
| 2.1.2. Diyabet tipleri.....                     | 5     |
| 2.1.3. Diyabet tanısı.....                      | 6     |
| 2.1.4. Global diyabet yükü ve prevalansı .....  | 7     |
| 2.1.5. Diyabetle ilişkili mortalite.....        | 10    |
| 2.2. Tip 2 Diyabet.....                         | 13    |
| 2.2.1. Tip 2 diyabetin epidemiyolojisi.....     | 13    |
| 2.2.2. Tip 2 diyabetin patofizyolojisi .....    | 14    |
| 2.2.3. Tip 2 diyabetin semptomları.....         | 16    |
| 2.2.4. Tip 2 diyabetin risk faktörleri.....     | 16    |
| 2.2.5. Tip 2 diyabet ve komplikasyonları.....   | 17    |
| 2.2.6. Tip 2 diyabet ve genetik .....           | 21    |
| 2.3. Çalışmadaki Genler .....                   | 23    |
| 2.3.1. NAMPT Geni .....                         | 23    |

|                                                                                                | <b>Sayfa</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.3.2. IL-6 Geni .....                                                                         | 28           |
| 2.3.3. Vaspın Geni .....                                                                       | 31           |
| 2.4. Çalışmadaki Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP) .....                                     | 34           |
| 2.4.1. <i>NAMPT</i> geni ve SNP'leri .....                                                     | 34           |
| 2.4.2. <i>IL-6</i> geni ve SNP'leri .....                                                      | 34           |
| 2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP).....       | 35           |
| 2.5.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....                                                  | 35           |
| 2.5.2. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP).....                                     | 36           |
| 2.6. Real-Time PCR (qPCR) ve LightSNiP Assay .....                                             | 37           |
| <b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>                                                              | <b>39</b>    |
| 3.1. Materyal .....                                                                            | 39           |
| 3.1.1. Kan örnekleri.....                                                                      | 39           |
| 3.1.2. Kimyasal malzemeler .....                                                               | 39           |
| 3.1.3. Sarf malzeme ve cihazlar .....                                                          | 40           |
| 3.1.4. Çözeltilerin hazırlanışı .....                                                          | 40           |
| 3.2. Yöntem.....                                                                               | 41           |
| 3.2.1. Kandan DNA izolasyonu.....                                                              | 41           |
| 3.2.2. DNA konsantrasyonlarının ölçümü.....                                                    | 42           |
| 3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu .....                                                       | 42           |
| 3.2.4. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP).....                                     | 45           |
| 3.2.5. LightSNiP Assay ile kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR (qPCR)) ..... | 50           |
| 3.2.6. İstatistiksel analizleri.....                                                           | 51           |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                                                                       | <b>53</b>    |
| 4.1. Çalışma Gruplarının Verileri.....                                                         | 53           |
| 4.2. NanoDrop ile DNA Konsantrasyon Ölçümü .....                                               | 53           |



**Sayfa**

|                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....                                                       | 56  |
| 4.3.1. <i>NAMPT</i> genine ait SNP'lerin PCR jel görüntüleri .....                           | 57  |
| 4.3.2. <i>IL-6</i> genine ait SNP'lerin PCR jel görüntüleri .....                            | 58  |
| 4.3.3. <i>Vaspin</i> genine ait SNP'lerin PCR jel görüntüleri .....                          | 59  |
| 4.3. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) .....                                    | 60  |
| 4.3.1. <i>NAMPT</i> genine ait SNP'lerin RFLP jel görüntüleri ve sonuçları .....             | 60  |
| 4.3.2. <i>IL-6</i> genine ait SNP'lerin RFLP jel görüntüleri ve sonuçları .....              | 62  |
| 4.3.3. <i>Vaspin</i> genine ait SNP'lerin RFLP jel görüntüleri ve sonuçları .....            | 64  |
| 4.4. LightSNiP Assay ile Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR (qPCR)) ..... | 66  |
| 4.4.1. <i>NAMPT</i> genine ait SNP'lerin Real-Time PCR sonuçları .....                       | 67  |
| 4.4.2. <i>IL-6</i> genine ait SNP'lerin Real-Time PCR sonuçları .....                        | 67  |
| 4.4.3. <i>Vaspin</i> genine ait SNP'lerin Real-Time PCR sonuçları .....                      | 68  |
| 4.5. İstatistiksel Analizler .....                                                           | 68  |
| 4.5.1. PCR-RFLP bulgularının istatistiksel analizi .....                                     | 68  |
| 4.5.2. qPCR (LightSNiP Assay) bulgularının istatistiksel analizi .....                       | 76  |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                            | 87  |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                                                   | 97  |
| KAYNAKLAR .....                                                                              | 99  |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                               | 113 |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                       | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 2.1. Akraba yakınlığına göre Tip 2 diyabet geliştirme riskleri.....                                   | 21    |
| Çizelge 2.3. <i>IL-6</i> geni özellikleri .....                                                               | 28    |
| Çizelge 2.4. <i>Vaspin</i> geni özellikleri .....                                                             | 31    |
| Çizelge 3.1. SNP'ler için kullanılan primerler ve PCR ürünlerinin boyutları. ....                             | 42    |
| Çizelge 3.2. PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları.....                                                | 43    |
| Çizelge 3.3. rs61330082 ve rs2058539 SNP'leri için kullanılan PCR programları. ....                           | 43    |
| Çizelge 3.4. rs2069860 ve rs1554606 SNP'leri için kullanılan PCR programları. ....                            | 44    |
| Çizelge 3.5. rs77060950 ve rs2236242 SNP'leri için kullanılan PCR programları. ....                           | 44    |
| Çizelge 3.6. Her SNP için kullanılan restriksiyon enzimleri ve kesim bölgeleri. ....                          | 45    |
| Çizelge 3.7. Restriksiyon enzim kesimi bileşenleri ve miktarları. ....                                        | 45    |
| Çizelge 3.8. Kullanılan restriksiyon enzimlerinin Bufferları ve inkübasyon süreleri. ...                      | 46    |
| Çizelge 3.9. LightSNiP Assay Kantitatif PCR (qPCR) Reaksiyon Mix bileşenleri ve miktarları. ....              | 50    |
| Çizelge 3.10. LightSNiP Assay için kullanılan LightCycler® 480 II Cihaz Programı ..                           | 51    |
| Çizelge 4.1. Çalışma gruplarının yaş, cinsiyet, VKİ, T2DM süreleri ve kan değerleri. .                        | 53    |
| Çizelge 4.2. Komplikasyonu olmayan hasta grubu NanoDrop ölçümleri. ....                                       | 54    |
| Çizelge 4.3. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubu NanoDrop ölçümleri. ....                                | 55    |
| Çizelge 4.4. Makrovasküler komplikasyonlu hasta grubu NanoDrop ölçümleri.....                                 | 55    |
| Çizelge 4.5. Kontrol (sağlıklı) grubu NanoDrop ölçümleri. ....                                                | 56    |
| Çizelge 4.6. Gruplara göre rs61330082 SNP'inin RFLP ile elde edilen WT, homozigot, heterozigot sayıları. .... | 60    |
| Çizelge 4.7. Gruplara göre rs2058539 SNP'inin RFLP ile elde edilen WT, homozigot, heterozigot sayıları. ....  | 61    |
| Çizelge 4.8. Gruplara göre rs2069860 SNP'inin RFLP ile elde edilen WT, homozigot, heterozigot sayıları. ....  | 62    |
| Çizelge 4.9. Gruplara göre rs1554606 SNP'inin RFLP ile elde edilen WT, homozigot, heterozigot sayıları. ....  | 63    |

| Çizelge                                                                                                                     | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 4.10. Gruplara göre rs77060950 SNP'inin RFLP ile elde edilen WT, homozigot, heterozigot sayıları. ....              | 64    |
| Çizelge 4.11. Gruplara göre rs2236242 SNP'inin RFLP ile elde edilen WT, homozigot, heterozigot sayıları. ....               | 65    |
| Çizelge 4.12. Gruplara göre rs61330082 SNP'inin LightSNiP Assay ile elde edilen allel sayıları. ....                        | 67    |
| Çizelge 4.13. Gruplara göre rs2058539 SNP'inin LightSNiP Assay ile elde edilen allel sayıları. ....                         | 67    |
| Çizelge 4.14. Gruplara göre rs2069860 SNP'inin LightSNiP Assay ile elde edilen allel sayıları. ....                         | 67    |
| Çizelge 4.15. Gruplara göre rs1554606 SNP'inin LightSNiP Assay ile elde edilen allel sayıları. ....                         | 67    |
| Çizelge 4.16. Gruplara göre rs77060950 SNP'inin LightSNiP Assay ile elde edilen allel sayıları. ....                        | 68    |
| Çizelge 4.17. Gruplara göre rs2236242 SNP'inin LightSNiP Assay ile elde edilen allel sayıları. ....                         | 68    |
| Çizelge 4.18. PCR-RFLP ile elde edilen genotip dağılımı, allel sıklığı, $p$ değeri ve olasılık oranı (OR). ....             | 74    |
| Çizelge 4.19. PCR-RFLP bulgularına uygulanan $\chi^2$ testi. ....                                                           | 75    |
| Çizelge 4.20 PCR-RFLP bulguları ile hesaplanan referans ve alternatif allel yaygınlıkları. ....                             | 76    |
| Çizelge 4.21. Real-Time PCR (qPCR) ile elde edilen genotip dağılımı, allel sıklığı, $p$ değeri ve olasılık oranı (OR). .... | 82    |
| Çizelge 4.22. Real-Time PCR (qPCR) bulgularına uygulanan $\chi^2$ testi. ....                                               | 83    |
| Çizelge 4.23. qPCR bulguları ile hesaplanan referans ve alternatif allel yaygınlıkları. .                                   | 84    |
| Çizelge 4.24. Çalışma gruplarına göre haplotip sıklıkları. ....                                                             | 85    |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                                                                                      | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. WHO'nun 1999 yılındaki raporunda bulunan diyabet sınıflandırması, glisemi bozukluklarının etiyolojik ve klinik evrelere göre düzenlenmiş şeması. ....           | 4     |
| Şekil 2.2. Diyabet tiplerinin sınıflandırması. ....                                                                                                                        | 5     |
| Şekil 2.3. Diyabet tanı kriterleri ve eşik değerleri ....                                                                                                                  | 7     |
| Şekil 2.4. 2021-2045 yılları arasında dünya geneli ve IDF bölgeleri için öngörülen diyabet prevalansları ve artış oranları ....                                            | 8     |
| Şekil 2.5. IDF Avrupa bölgesi yaşa göre ayarlanmış (20-79 yaş) karşılaştırmalı prevalans haritası (2021). ....                                                             | 9     |
| Şekil 2.6. IDF EUR bölgesindeki yaşa göre ayarlanmış (20-79 yaş) karşılaştırmalı prevalans ve diyabetli kişilerin sayısı, ilk 5 ülke (2021) ....                           | 10    |
| Şekil 2.7. Küresel ölüm nedenleri. ....                                                                                                                                    | 11    |
| Şekil 2.8. 2000 yılında Türkiye'deki ilk 10 ölüm nedeni ....                                                                                                               | 12    |
| Şekil 2.9. 2019 yılında Türkiye'deki ilk 10 ölüm nedeni ....                                                                                                               | 12    |
| Şekil 2.10. Tip 2 diyabetin patofizyolojik faktörleri. ....                                                                                                                | 14    |
| Şekil 2.11. Tip 2 diyabetin patofizyolojisi, hipergliseminin gelişmesine yol açan faktörler. ....                                                                          | 15    |
| Şekil 2.12. Beta hücresi disfonksiyonunda rol alan patogenetik faktörler. ....                                                                                             | 15    |
| Şekil 2.13. Tip 2 diyabetin gelişimindeki risk faktörleri. ....                                                                                                            | 17    |
| Şekil 2.14. Diyabetin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları. IHD: iskemik kalp hastalığı, CHF: konjestif kalp yetmezliği, PAD: periferik arter hastalığı. ....   | 17    |
| Şekil 2.15. AGE reseptörü (RAGE) aktivasyonunun diyabet ile ilişkili makrovasküler hastalıkların oluşumundaki rolü ve sinyal yolları. ....                                 | 20    |
| Şekil 2.16. Türkiye'de mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların prevalansları (2021) ....                                                                          | 21    |
| Şekil 2.17. Tip 2 diyabet ile ilişkili genetik varyantlar (Gen isimleri varyantları temsil etmektedir, varyantların konumları gen bölgesinde veya genin yakınındadır) .... | 22    |
| Çizelge 2.2. <i>NAMPT</i> geni özellikleri. ....                                                                                                                           | 23    |

| Şekil                                                                                                               | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.18. Kromozom 7 üzerindeki NAMPT geninin konumu .....                                                        | 23    |
| Şekil 2.19. Kromozom 7 üzerinde bulunan <i>NAMPT</i> geni. ....                                                     | 24    |
| Şekil 2.20. NAD biyosentezi, NAMPT'ın katalizasyonu ile NAM'dan NMN edilmesi ve ardından NAD'a dönüştürülmesi. .... | 25    |
| Şekil 2.21. eNAMPT'in farklı hücre tiplerindeki sinyal yolları ve etkileri .....                                    | 26    |
| Şekil 2.22. iNAMPT ve eNAMPT'in hücrede görev aldığı sinyal yolları.....                                            | 27    |
| Şekil 2.23. Pankreas hücrelerindeki insülin salınımının NAMPT tarafından düzenlenmesi .....                         | 28    |
| Şekil 2.24. Kromozom 7 üzerindeki <i>IL-6</i> geninin konumu. ....                                                  | 28    |
| Şekil 2.25. Kromozom 7 üzerinde bulunan <i>IL-6</i> geni.....                                                       | 29    |
| Şekil 2.26. <i>IL-6</i> hücre içi sinyal yolları, klasik sinyalizasyon ve trans-sinyalizasyon. ....                 | 30    |
| Şekil 2.27. <i>IL-6</i> 'nın adipositlerdeki insülin sinyalizasyonunun düzenlenmesindeki rolü ..                    | 31    |
| Şekil 2.28. Kromozom 14 üzerindeki <i>SERPINA12</i> geninin konumu. ....                                            | 32    |
| Şekil 2.29. Kromozom 14 üzerinde bulunan <i>Vaspin</i> geni .....                                                   | 32    |
| Şekil 2.30. Adipoz dokudan salgılanan vaspinin insülin direnci ile ilişkisi . ....                                  | 33    |
| Şekil 2.31. Polimeraz zincir reaksiyonu ve adımları .....                                                           | 36    |
| Şekil 2.32. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi .....                                                           | 37    |
| Şekil 2.33. Floresan etiketli problemler ile erime eğrisi analizi .....                                             | 38    |
| Şekil 2.34. SimpleProbe çalışma formatı.....                                                                        | 38    |
| Şekil 3.1. <i>NAMPT</i> geni rs61330082 SNP'inin beklenen restriksiyon enzim kesimi jel görüntüsü.....              | 47    |
| Şekil 3.2. <i>NAMPT</i> geni rs2058539 SNP'inin beklenen restriksiyon enzim kesimi jel görüntüsü.....               | 47    |
| Şekil 3.3. <i>IL-6</i> geni rs2069860 SNP'inin beklenen restriksiyon enzim kesimi jel görüntüsü.....                | 48    |
| Şekil 3.4. <i>IL-6</i> geni rs1554606 SNP'inin beklenen restriksiyon enzim kesimi jel görüntüsü.....                | 48    |
| Şekil 3.5. <i>Vaspin</i> geni rs77060950 SNP'inin beklenen restriksiyon enzim kesimi jel görüntüsü.....             | 49    |

| Şekil                                                                                                                                                                              | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 3.6. <i>Vaspin</i> geni rs2236242 SNP'inin beklenen restriksiyon enzim kesimi jel görüntüsü.....                                                                             | 49    |
| Şekil 4.1. DNA örneklerinin NanoDrop ölçüm grafiği.....                                                                                                                            | 54    |
| Şekil 4.2. rs61330082 SNP'ine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....                                                                                                               | 57    |
| Şekil 4.3. rs2058539 SNP'ine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....                                                                                                                | 57    |
| Şekil 4.4. rs2069860 SNP'ine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....                                                                                                                | 58    |
| Şekil 4.5. rs1554606 SNP'ine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....                                                                                                                | 58    |
| Şekil 4.6. rs77060950 SNP'ine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....                                                                                                               | 59    |
| Şekil 4.7. rs2236242 SNP'ine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....                                                                                                                | 59    |
| Şekil 4.8. rs61330082 SNP'ine ait RFLP ürünlerinin jel görüntüsü. Uncut: Enzim ile muamele edilmemiş PCR ürünü, WT: Yabanıl tip, Hom: Homozigot, Het: Heterozigot.....             | 60    |
| Şekil 4.9. rs2058539 SNP'ine ait RFLP ürünlerinin jel görüntüsü. Uncut: Enzim ile muamele edilmemiş PCR ürünü, WT: Yabanıl tip, Hom: Homozigot, Het: Heterozigot.....              | 61    |
| Şekil 4.10. rs2069860 SNP'ine ait RFLP ürünlerinin jel görüntüsü. Uncut: Enzim ile muamele edilmemiş PCR ürünü, WT: Yabanıl tip, Hom: Homozigot, Het: Heterozigot.....             | 62    |
| Şekil 4.11. rs1554606 SNP'ine ait RFLP ürünlerinin jel görüntüsü. Uncut: Enzim ile muamele edilmemiş PCR ürünü, WT: Yabanıl tip, Hom: Homozigot, Het: Heterozigot.....             | 63    |
| Şekil 4.12. rs77060950 SNP'ine ait RFLP ürünlerinin jel görüntüsü. Uncut: Enzim ile muamele edilmemiş PCR ürünü, WT: Yabanıl tip, Hom: Homozigot, Het: Heterozigot.....            | 64    |
| Şekil 4.13. rs2236242 SNP'ine ait RFLP ürünlerinin jel görüntüsü. Uncut: Enzim ile muamele edilmemiş PCR ürünü, WT: Yabanıl tip, Hom: Homozigot, Het: Heterozigot.....             | 65    |
| Şekil 4.14. Real-Time PCR (qPCR) sonucunda elde edilen rs61330082, rs2058539, rs2069860, rs1554606, rs77060950 ve rs2236242 SNP'lerinin erime eğrisi ve erime pikleri grafiği..... | 66    |
| Şekil 4.15. rs61330082 SNP'inin çalışma gruplarına göre PCR-RFLP ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.....                                                      | 69    |
| Şekil 4.16. rs2058539 SNP'inin çalışma gruplarına göre PCR-RFLP ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği. ....                                                      | 70    |

| <b>Şekil</b>                                                                                                                    | <b>Sayfa</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Şekil 4.17. rs2069860 SNP'inin çalışma gruplarına göre PCR-RFLP ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği. ....   | 71           |
| Şekil 4.18. rs1554606 SNP'inin çalışma gruplarına göre PCR-RFLP ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği. ....   | 72           |
| Şekil 4.19. rs770660950 SNP'inin çalışma gruplarına göre PCR-RFLP ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği. .... | 73           |
| Şekil 4.20. rs2236242 SNP'inin çalışma gruplarına göre PCR-RFLP ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği. ....   | 74           |
| Şekil 4.21. rs61330082 SNP'inin çalışma gruplarına göre qPCR ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği. ....      | 77           |
| Şekil 4.22. rs2058539 SNP'inin çalışma gruplarına göre qPCR ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği. ....       | 78           |
| Şekil 4.23. rs2069860 SNP'inin çalışma gruplarına göre qPCR ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği. ....       | 79           |
| Şekil 4.24. rs1554606 SNP'inin çalışma gruplarına göre qPCR ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği. ....       | 80           |
| Şekil 4.25. rs770660950 SNP'inin çalışma gruplarına göre qPCR ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği. ....     | 81           |
| Şekil 4.26. rs2236242 SNP'inin çalışma gruplarına göre qPCR ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği. ....       | 82           |
| Şekil 4.27. Hasta gruplarına göre haplotip sıklıkları .....                                                                     | 85           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

### Açıklamalar

|           |            |
|-----------|------------|
| <b>ml</b> | Mililitre  |
| <b>µl</b> | Mikrolitre |
| <b>bp</b> | Baz çifti  |
| <b>mM</b> | Milimolar  |
| <b>ng</b> | Nanogram   |
| <b>°C</b> | Celcius    |

### Kısaltmalar

### Açıklamalar

|                |                                                   |
|----------------|---------------------------------------------------|
| <b>ADA</b>     | Amerikan Diyabet Derneği                          |
| <b>AGE</b>     | İleri glikasyon son ürünü                         |
| <b>CAD</b>     | Koroner arter hastalığı                           |
| <b>CHF</b>     | Konjestif kalp yetmezliği                         |
| <b>CVD</b>     | Kardiyovasküler hastalıklar                       |
| <b>eNAMPT</b>  | Hücre dışı NAMPT                                  |
| <b>ER</b>      | Endoplazmik retikulum                             |
| <b>GDM</b>     | Gestasyonel diabetes mellitus                     |
| <b>GSIS</b>    | Glikoz uyarımı ile gerçekleşen insülin sekresyonu |
| <b>IDDM</b>    | İnsüline bağımlı diabetes mellitus                |
| <b>IDF EUR</b> | Ulusal Diyabet Federasyonu Avrupa bölgesi         |
| <b>IDF</b>     | Ulusal Diyabet Federasyonu                        |
| <b>IHD</b>     | İsemik kalp hastalığı                             |
| <b>IL-6</b>    | İnterlökin-6                                      |
| <b>IL-6R</b>   | İnterlökin-6 reseptörü                            |
| <b>iNAMPT</b>  | Hücre içi NAMPT                                   |
| <b>NAD</b>     | Nikotinamid adenin dinükleotit                    |
| <b>NAM</b>     | Nikotinamid                                       |



**Kısaltmalar****Açıklamalar**

|                 |                                               |
|-----------------|-----------------------------------------------|
| <b>NAMPT</b>    | Nikotinamid fosforibozil transferaz           |
| <b>NAPRTase</b> | Nikotinik asit fosforiboziltransferaz         |
| <b>NCD</b>      | Bulaşıcı olmayan hastalıklar                  |
| <b>NDDG</b>     | Ulusal Diyabet Data Grubu                     |
| <b>NIDDM</b>    | İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus    |
| <b>NNM</b>      | Nikotinamid mononükleotid                     |
| <b>OGTT</b>     | Oral glikoz tolerans testi                    |
| <b>PAD</b>      | Periferik arter hastalığı                     |
| <b>PBEF</b>     | Pre- $\beta$ hücresi koloni arttırıcı faktör  |
| <b>PCOS</b>     | Polikistik over sendromu                      |
| <b>PCR</b>      | Polimeraz zincir reaksiyonu                   |
| <b>PRPP</b>     | 5-fosforibosil-1-pirofosfat                   |
| <b>qPCR</b>     | Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu        |
| <b>RAGE</b>     | İleri glikasyon son ürünü reseptörü           |
| <b>RFLP</b>     | Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi       |
| <b>ROS</b>      | Reaktif oksijen türleri                       |
| <b>sIL-6R</b>   | Çözünür formda bulunan interlökin-6 reseptörü |
| <b>SNP</b>      | Tek nükleotid polimorfizmi                    |
| <b>T1DM</b>     | Tip 1 diyabet / Tip 1 diabetes mellitus       |
| <b>T2DM</b>     | Tip 2 diyabet / Tip 2 diabetes mellitus       |
| <b>WHO</b>      | Dünya Sağlık Örgütü                           |

## 1. GİRİŞ

Dünyadaki en yaygın metabolik hastalıklardan biri olan diyabetin son yıllarda küresel yükünü önemli derecede artmıştır. Hiperglisemi ile karakterize olan diyabet hastalığı çok faktörlü bir yapıya sahiptir. Diyabet sınıflandırması Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği kriterlere göre yapılır ve en yaygın diyabet türleri tip 1, tip 2 ve gestasyonel diyabettir [1, 2].

2021 yılında diyabet hastası olan kişilerin sayısının 537 milyon olduğu ve bu sayının 2045 yılında 783 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir [1]. IDF Avrupa (EUR) bölgesinde ise diyabet hastası kişilerin sayısının 61 milyon (%9,2 prevalans) olduğu düşünülmektedir (2021) [1]. Türkiye, 2021 yılında IDF Avrupa bölgesinde en yüksek diyabet hastası kişi sayısına ve prevalansına sahip ülkedir [1]. Mortalite oranlarına bakıldığında diyabet hastalığı, dünya genelindeki ilk 10 ölüm nedeni arasında yer alır. Türkiye'de 2021 yılında diyabete bağlı ölüm oranları %4 civarındadır [1].

En yaygın diyabet tipi olan tip 2 diyabet çok faktörlü bir hastalıktır [1]. Diyabet vakalarının büyük çoğunluğu (%90-95) tip 2 diyabettir [1]. Pankreas pankreas  $\beta$  hücrelerindeki fonksiyon bozuklukları ile azalan insülin sekresyonu ve insülinin etkisinin azalması tip 2 diyabetin gelişiminde rol oynamaktadır [3].

Tip 2 diyabette kronik hipergliseminin süresine ve derecesine bağlı olarak mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar oluşur [3]. Tip 2 diyabetin mikrovasküler komplikasyonları arasında retinopati, nefropati ve nöropati gibi hastalıklar bulunur [1-3]. Makrovasküler komplikasyonları ise ağırlıklı olarak kardiyovasküler hastalıklar ve serebrovasküler hastalıklardır [1-3].

Tip 2 diyabetin genetik ve çevresel olan birçok risk faktör bulunur [2]. Genetik risk faktörlerinin yapısı karmaşıktır [3]. Genetiğin %20 – 80 arasında değişen oranlarda tip 2 diyabete yatkınlık oluşturduğu düşünülmektedir [2, 3]. Tip 2 diyabetin gelişimindeki genetik faktörler ile ilgili birçok tek nükleotid polimorfizm (SNP) çalışması bulunur [3].

*NAMPT*, NAD biyosentezinde önemli rol oynayan bir adipositokini kodlayan genidir [4]. *IL-6* geni inflamatuvar özelliklere sahip çok işlevli bir sitokini kodlar [5]. *Vaspin* (ya da *SERPINA12*) geni serpin proteaz inhibitör ailesine ait bir adipositokini kodlar [6].

Yapılan bu tez çalışmasında, *NAMPT* geninin rs61330082 ve rs2058539, *IL-6* geninin rs2069860 ve rs1554606 ve *Vaspin* geninin rs77060950 ve rs2236242 SNP'leri için polimeraz zincir reaksiyonu – restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (ya da restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi) (PCR-RFLP) ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR, qPCR) gerçekleştirilerek Tip 2 diyabet ile olası ilişkilerini belirlemek hedeflenmiştir.

Yapılan bu tez çalışması ile *NAMPT*, *IL-6* ve *Vaspin*'in Tip 2 diyabet hastalığındaki rolü ve işlevin belirlenebilmesi ve tanı ile tedavide yeni yöntemlerin geliştirilmesine katkı sağlamak amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Diabetes Mellitus (Diyabet)

Diabetes Mellitus ya da daha yaygın kullanılan ismiyle diyabet; insülin sekresyonu, insülin etkisi veya her ikisindeki bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkan ve hiperglisemi (yüksek kan şekeri düzeyi) ile karakterize olan metabolik bir hastalıktır [1, 2]. Hiperglisemi, vücutta yeterli miktarda insülin bulunmadığında veya var olan insülinin kanda artan glikoz konsantrasyonunu düşürmek amacıyla etkili bir biçimde kullanılamamasıyla ortaya çıkar [1, 3]. En yaygın metabolik hastalıklardan biri olan diyabet karmaşık ve çok faktörlü bir etiyolojiye sahiptir [3]. Hastalığın gelişimi kronik hiperglisemiyle olduğu kadar karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasındaki bozulmalarla da ilişkilidir [7]. Zamanla, hipergliseminin şiddetinin derecesine ve süresine bağlı olarak mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar ile sonuçlanan vasküler hasarlar gelişir [3]. Diyabetin uzun süreli komplikasyonlarından biri olan mikrovasküler komplikasyonlar retinopati, nefropati ve nöropatiyi içermektedir [3, 7, 8]. Uzun süreli komplikasyonlardan bir diğeri olan makrovasküler komplikasyonların sınıflandırması içerisinde koroner arter hastalığı (CAD), periferik arter hastalığı (PAD) gibi kardiyovasküler hastalıklar (CVD) ve serebrovasküler hastalıklar bulunmaktadır [3, 7, 8]. Diyabet, kronik makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonları sebebiyle önemli ölçüde morbidite ve mortalite oranlarına sahiptir [9].

#### 2.1.1. Diyabet sınıflandırması

Günümüze kadar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Amerikan Diyabet Derneği (ADA) gibi kuruluşlar birçok kez diyabet sınıflandırması yapmış ve bu sınıflandırmalar için farklı kriterler kullanmıştır. 1980 yılında WHO'nun yayınladığı raporda, Ulusal Diyabet Data Grubu'nun (NDDG) [10] belirlediği kriterler kullanılarak ilk kez dört ana gruba ayrılmış bir sınıflandırma yapılmıştır [11]. Bu gruplar; (i) insüline bağımlı diyabet (IDDM, tip 1), (ii) insüline bağımlı olmayan diyabet (NIDDM, tip 2), (iii) “diğer türler” ve (iv) gestasyonel diyabet (veya gebelik diyabeti) (GDM) olarak tanımlanmıştır [3, 11]. 1999'da yayınlanan WHO raporuna göre ise [12], Kuzuya ve Matsuda'nın [13] önerilerine dayanarak hem etiyoloji hem de hastalığın klinik evreleri ayrı bir şekilde temel alınarak bir sınıflandırma yapılmıştır [3, 14] (Şekil 2.1).

| Aşamalar<br><br>Tipler                                                                                                                                                                                                       | Normoglisemi            | Hiperglisemi                                   |                       |                                 |                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                              | Normal glikoz toleransı | Bozulmuş glikoz regülasyonu<br>IGT ve/veya IFG | Diabetes Mellitus     |                                 |                                        |
|                                                                                                                                                                                                                              |                         |                                                | İnsülin gerektirmeyen | Kontrol için insülin gerektiren | Hayatta kalmak için insülin gerektiren |
| <b>Tip 1</b><br>• Otoimmün<br>• İdyopatik<br><br><b>Tip 2*</b><br>• Ağırıklı olarak insülin direnci<br>• Ağırıklı olarak insülin sekresyon kusurları<br><br><b>Diğer spesifik tipler*</b><br><br><b>Gestasyonel diyabet*</b> | ←                       |                                                |                       |                                 | →                                      |
|                                                                                                                                                                                                                              | ←                       |                                                |                       | →                               | →                                      |
|                                                                                                                                                                                                                              | ←                       |                                                |                       | →                               | →                                      |
|                                                                                                                                                                                                                              | ←                       |                                                |                       | →                               | →                                      |

\* Nadir durumlarda, bu kategorilerdeki hastalar (örn. Vacor toksisitesi, gebelikte ortaya çıkan tip 1, vb.) hayatta kalmak için insüline ihtiyaç duyabilir.

Şekil 2.1. WHO'nun 1999 yılındaki raporunda [12] bulunan diyabet sınıflandırması, glisemi bozukluklarının etiyolojik ve klinik evrelere göre düzenlenmiş şeması [15].

WHO'nun diyabet sınıflandırması için 2019 yılında yayınladığı son raporda, diyabet tiplerinin sınıflandırması için kullanılan en güncel tablo yer almaktadır (Şekil 2.2) [15].

|                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tip 1 diyabet</b>                                                                                                                  |
| <b>Tip 2 diyabet</b>                                                                                                                  |
| <b>Diyabetin hibrit formları</b>                                                                                                      |
| Yetişkinlerin yavaş gelişen immün aracılı diyabeti                                                                                    |
| Ketozis eğimli tip 2 diyabet                                                                                                          |
| <b>Diğer spesifik tipler</b>                                                                                                          |
| Monogenik diyabet                                                                                                                     |
| - $\beta$ hücresi fonksiyonunun monogenik bozuklukları                                                                                |
| - İnsülin etkisindeki monogenik bozukluklar                                                                                           |
| Ekzokrin pankreas hastalıkları                                                                                                        |
| Endokrin bozuklukları                                                                                                                 |
| İlaç veya kimyasal kaynaklı                                                                                                           |
| Enfeksiyonlar                                                                                                                         |
| Bağıışıklık aracılı diyabetin nadir görülen spesifik formları                                                                         |
| Bazen diyabet ile ilişkili olan diğer genetik sendromlar                                                                              |
| <b>Sınıflandırılmamış diyabet</b>                                                                                                     |
| Bu kategori özellikle diyabetin teşhis zamanına yakın bir dönemde net bir teşhis kategorisi olmadığında geçici olarak kullanılmalıdır |
| <b>İlk kez hamilelik sırasında tespit edilen hiperglisemi</b>                                                                         |
| Hamilelikte diabetes mellitus                                                                                                         |
| Gestasyonel diabetes mellitus                                                                                                         |

Şekil 2.2. Diyabet tiplerinin sınıflandırması (WHO 2019) [15].

### 2.1.2. Diyabet tipleri

Dünya genelinde en yaygın 3 diyabet türü; tip 1 diyabet, tip 2 diyabet ve gestasyonel diyabettir [1].

#### Tip 1 diyabet

Tip 1 diyabet (T1DM) (önceden insüline bağımlı diyabet veya juvenil başlangıçlı diyabet olarak adlandırılan diyabet türü), tüm diyabet vakalarının yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır [16]. Tip 1 diyabet, pankreastaki insülin üretiminden ve sekresyonundan sorumlu beta hücrelerinin bağıışıklık sistemi tarafından yıkıma uğratıldığı otoimmün bir süreçten kaynaklanır [1, 17]. Beta hücrelerinin yıkımı mutlak insülin eksikliğine sebep olur [3, 14]. Aşırı susuzluk, ani kilo kaybı, bulanık görüş, yorgunluk, devamlı açlık hissi, sık idrara çıkma ve diyabetik ketoasidoz tip 1 diyabet hastalığında görülen tipik semptomlardır [1]. Endojen

insülin miktarının çok az olması veya hiç bulunmamasından dolayı, tip 1 diyabet hastaları kandaki glikoz seviyelerini düzenlemek ve için eksojen insüline ihtiyaç duyarlar [1, 3]. Tip 1 diyabet hastaları günlük olarak dışarıdan vücut içerisine insülin enjekte ederek ketoasidoz, koma ve ölüm gibi sonuçların gelişimini önlerler [8, 14].

### Tip 2 diyabet

Tip 2 diyabet (T2DM) (önceden insüline bağımlı olmayan diyabet veya yetişkin başlangıçlı diyabet olarak adlandırılan diyabet türü), tüm diyabet vakalarının neredeyse %90-95'ini oluşturmaktadır [1, 3, 15, 16]. Tip 2 diyabet insülin direnci ve insülin sekresyonu ile karakterizedir [1, 9, 14]. Tip 1 diyabetin aksine tip 2 diyabet, pankreas beta hücrelerinin disfonksiyonu dolayısıyla insülin sekresyonundaki bozukluklardan meydana gelen göreceli insülin eksikliğinden kaynaklanır [9, 15, 18]. Tip 2 diyabette görülen semptomlar tip 1 diyabette görülen semptomlarla benzerlik gösterebilir fakat tip 2 diyabet semptomları genellikle daha hafif seyretmektedir hatta bazı bireyler hiçbir semptom göstermeyebilir (asemptomatik) [1, 17]. Yine tip 1 diyabetli bireylerden farklı olarak, çoğu tip 2 diyabetli birey yaşamları boyunca eksojen insülin tedavisi uygulamak zorunda değildir [15, 16]. Tip 2 diyabet hastaları tedavi olarak düzenli egzersiz ve sağlıklı bir diyet içeren yaşam tarzı benimseyerek hastalığın etkilerini azaltılabilirler [1, 3].

#### **2.1.3. Diyabet tanısı**

Diyabet, semptomatik hiperglisemi veya onun yol açtığı komplikasyonlar ile teşhis edilebilir ancak bilindiği üzere dünya genelinde diyabet teşhisi yapılmamış birçok asemptomatik birey bulunmaktadır [1, 7, 18]. Bu durum diyabet tanısının yapılması için daha spesifik yöntemler kullanmayı gerektirmiştir. Diyabet hastalığı hiperglisemi ile karakterize olduğu için, diyabet tanısında uygulanan testler kan şekeri seviyelerini belirlemek üzerine yoğunlaşmıştır [14]. Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) ve Amerikan Diyabet Derneği'nin yaptığı önerilere göre diyabet tanısı için açlık plazma glikozu (açlık kan şekeri), HbA1c (glikolizlenmiş hemoglobin), random plazma glikozu ve 75-g oral glikoz tolerans testi (OGTT) ile tespit edilen 2-saatlik plazma glikozu değerleri kullanılmaktadır [1, 15, 16]. Belirlenen açlık plazma glikozu, 2-saatlik plazma glikozu, HbA1c ve random plazma glikozu eşik değerleri Şekil 2.3'te verilmiştir [1, 15, 16].

| Test                                                                                                                                                                          | Diabetes<br>Should be diagnosed if ONE OR MORE of the following criteria are met | Impaired Glucose Tolerance (IGT)<br>Should be diagnosed if BOTH of the following criteria are met | Impaired Fasting Glucose (IFG)<br>Should be diagnosed if THE FIRST OR BOTH of the following are met |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <br>Fasting plasma glucose                                                                   | $\geq 7.0$ mmol/L<br>(126 mg/dL)                                                 | $< 7.0$ mmol/L<br>(126 mg/dL)                                                                     | $6.1 - 6.9$ mmol/L<br>(110 - 125 mg/dL)                                                             |
| <br>Two-hour plasma glucose after 75g oral glucose load (oral glucose tolerance test (OGTT)) | $\geq 11.1$ mmol/L<br>(200 mg/dL)                                                | $\geq 7.8$ and $< 11.1$ mmol/L<br>(140-200 mg/dL)                                                 | $< 7.8$ mmol/L<br>(140 mg/dL)                                                                       |
| <br>HbA1c                                                                                    | $\geq 48$ mmol/mol<br>(equivalent to 6.5%)                                       |                                                                                                   |                                                                                                     |
| <br>Random plasma glucose in the presence of symptoms of hyperglycaemia                      | $\geq 11.1$ mmol/L<br>(200 mg/dL)                                                |                                                                                                   |                                                                                                     |

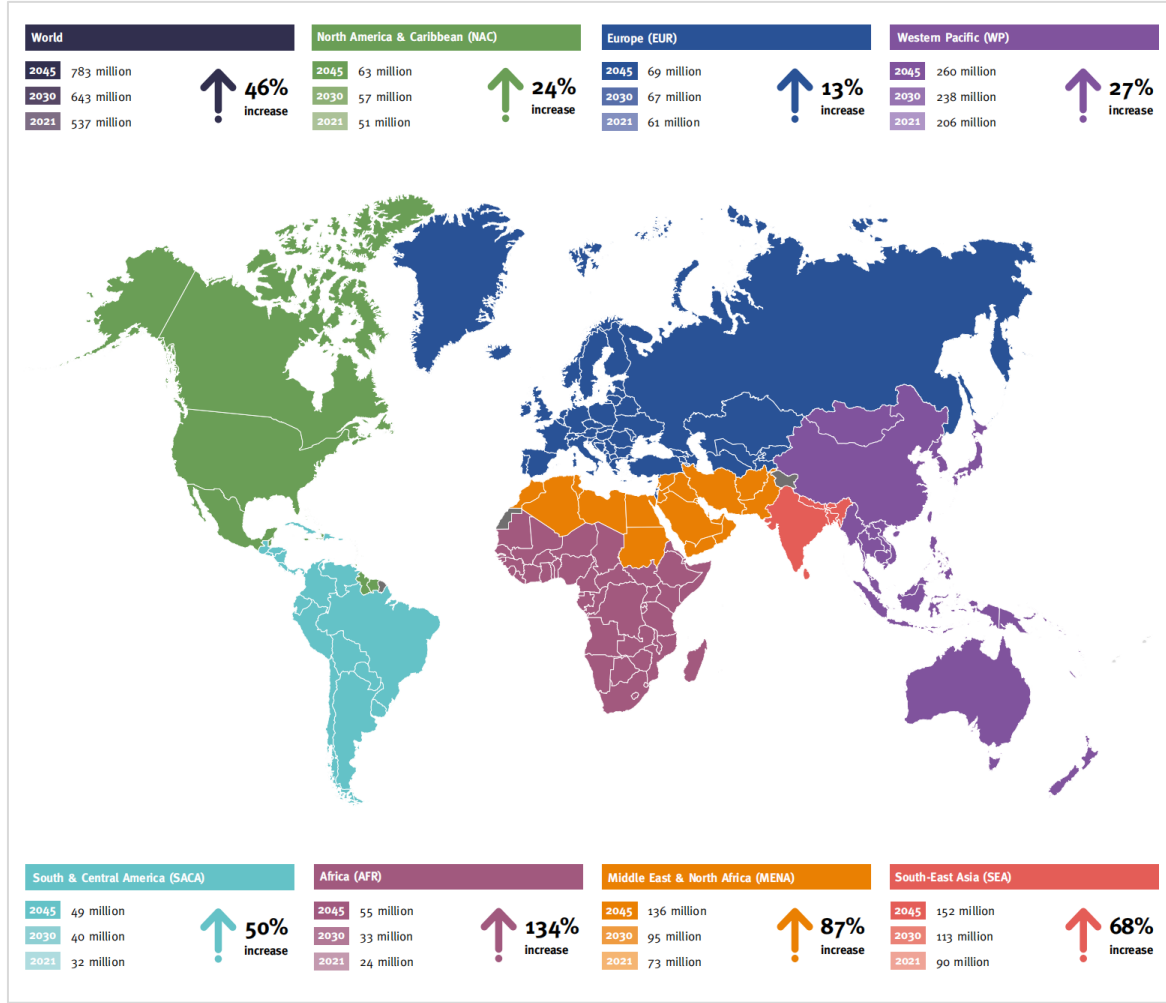
Şekil 2.3. Diyabet tanı kriterleri ve eşik değerleri [1].

Diyabet teşhisi için kullanılan genel testler dışında diyabet tipini belirlemek için kullanılan farklı testlerde bulunmaktadır ancak bu testler tanı koyma amacı ile kullanılmazlar. C-peptit, beta hücrelerindeki endojen insülin üretimi ve seviyelerini belirlemek için kullanılan bir markördür ve C-peptit testi sayesinde hastanın eksojen insülin tedavisine ihtiyacı olup olmadığı belirlenmektedir [7]. Otoantikör testi ise tip 1 diyabeti diğer diyabet türlerinden ayrılabilmek için kullanılmaktadır [7].

#### 2.1.4. Global diyabet yükü ve prevalansı

Son yıllarda diyabetin küresel yükü önemli ölçüde artmış ve gün geçtikçe de artmaya devam edecektir [19]. 1980 yılında %4,7 olarak belirlenen diyabet prevalansı 2014 yılında %8,5 oranına yükselerek büyük bir artış yaşamıştır [17]. 2021 yılında dünya üzerinde yaklaşık 537 milyon diyabet hastası olduğu tahmin edilmektedir [1], bu sayı dünya nüfusunun %6'sından fazlasını oluşturmaktadır. Diyabetli birey sayısının %46 gibi büyük bir artış göstererek (dünya nüfusunun %20 artacağı varsayılarak); 2030 yılında 643 milyon, 2045 yılında ise 783 milyona kadar varacağı tahmin edilmektedir (Şekil 2.4) [1].





Şekil 2.4. 2021-2045 yılları arasında dünya geneli ve IDF bölgeleri için öngörülen diyabet prevalansları ve artış oranları [1].

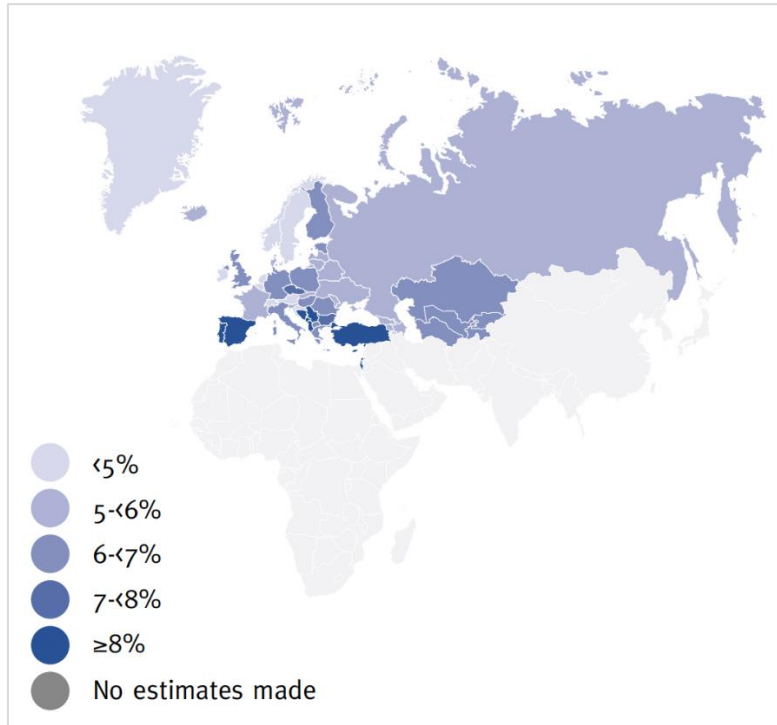
### Teşhis edilmemiş diyabetli bireyler

Öngörülen diyabetli birey sayıları diyabet hastalarıyla (tip 1 ve tip 2 diyabet) beraber diyabet teşhisi koyulmamış kişileri de kapsamaktadır [1]. 2021 yılında her iki yetişkinden biri diyabet hastalığına sahip olduğunun farkında olmadan yaşamlarını sürdürmüştür [1, 2], teşhis konmamış diyabetli kişiler 2021 yılında tahmin edilen diyabet hastalarının sayısının %44,7'si kadardır (239,7 milyon) [1]. Tanı koyulmamış diyabetli kişilerin ağırlıklı olarak büyük bir çoğunluğu tip 2 diyabete sahiptir [1].

### Avrupa bölgesi ve Türkiye’de diyabet

Uluslararası Diyabet Federasyonu, 2021 yılında IDF Avrupa (EUR) bölgesi için diyabet prevalansının %9,2 olduğunu ve diyabet hastası olan kişi sayısının 61 milyonu aştığını belirtmiştir [1, 20]. Avrupa bölgesinde teşhis edilmemiş diyabetli kişi sayısı yaklaşık olarak 22 milyondur (2021), her üç kişiden birine (%35,7) diyabet tanısı koyulmamış olduğu tahmin edilmektedir [1, 20].

IDF Avrupa bölgesinde bulunan ülkelere bakıldığında 2021 yılı için belirlenen yaşa göre ayarlanmış karşılaştırmalı prevalans verilerine göre, Türkiye Avrupa’daki en yüksek prevalansa sahip ülkedir (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6) [1, 20]. 2021 yılında Türkiye’de diyabet hastası olan 20 ila 79 yaş arasındaki kişi sayısı 9 milyondur ve bu kişilerin yaşa göre ayarlanmış karşılaştırmalı prevalansı %14,5’tur (Şekil 2.6) [1]. Türkiye’de diyabet tanısı koyulmamış kişilerin sayısı ise 3.7 milyondur (%41,8) (2021) [20].



Şekil 2.5. IDF Avrupa bölgesi yaşa göre ayarlanmış (20-79 yaş) karşılaştırmalı prevalans haritası (2021) [1].

| İlk 5 Ülke                                                                      |       |       |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|
|                                                                                 | 2011  | 2021  |
| Diyabetli kişilerin yaşa göre ayarlanmış prevalansı için ilk 5 ülke (20-79 yaş) |       |       |
| Türkiye                                                                         | %8,1  | %14,5 |
| İspanya                                                                         | %6,5  | %10,3 |
| Andorra <sup>i</sup>                                                            | %5,6  | %9,7  |
| Portekiz                                                                        | %9,8  | %9,1  |
| Sırbistan                                                                       | %7,9  | %9,1  |
|                                                                                 | 2011  | 2021  |
| Diyabetli kişilerin (20-79 yaş) sayısı (milyon olarak) için ilk 5 ülke          |       |       |
| Türkiye                                                                         | 3.5m  | 9m    |
| Rusya                                                                           | 12.6m | 7.4m  |
| Almanya                                                                         | 5m    | 6.2m  |
| İspanya                                                                         | 2.8m  | 5.1m  |
| İtalya                                                                          | 3.6m  | 4.5m  |
| <sup>i</sup> benzer ülkelerdeki ekstrapolasyona dayanarak                       |       |       |
| m= milyon b= milyar                                                             |       |       |

Şekil 2.6. IDF EUR bölgesindeki yaşa göre ayarlanmış (20-79 yaş) karşılaştırmalı prevalans ve diyabetli kişilerin sayısı, ilk 5 ülke (2021) [1].

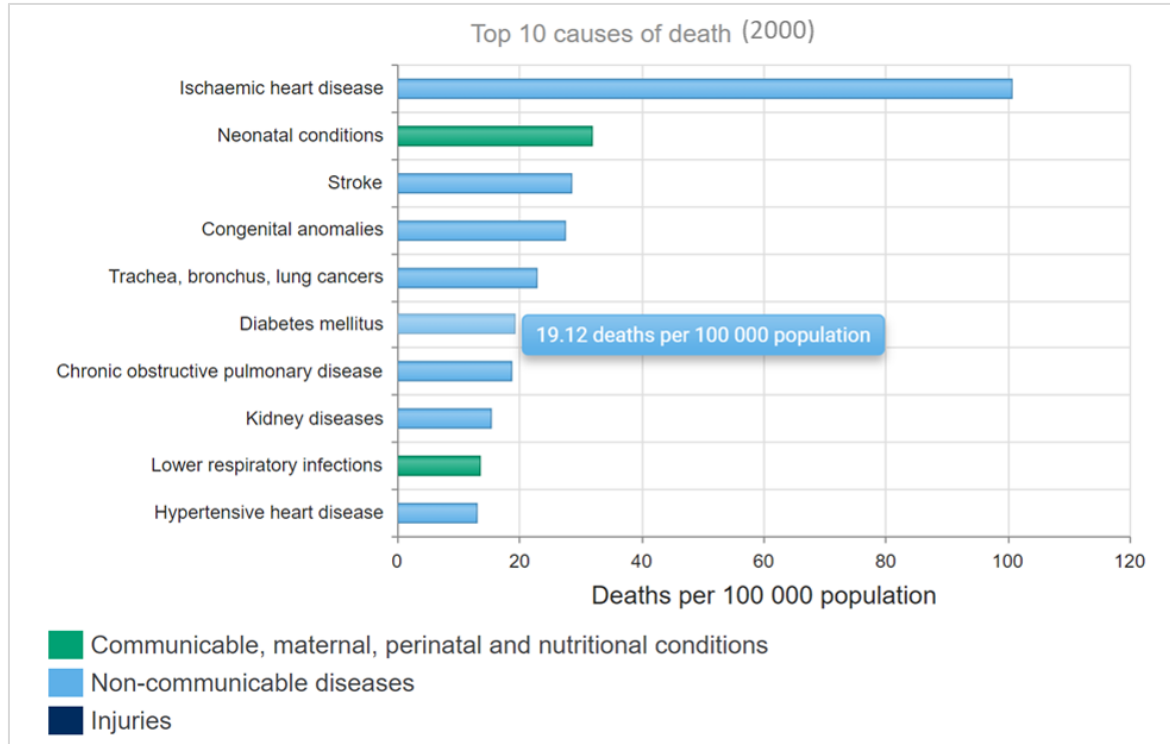
### 2.1.5. Diyabetle ilişkili mortalite

Bulaşıcı olmayan hastalıklar (noncommunicable diseases, NCDs) arasında bulunan diyabet dünya genelinde büyük mortalite oranlarına sahiptir [1, 17] ve 2019 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün açıkladığı küresel ölüm nedenleri içerisinde ilk 10'da 9. sırada yer almaktadır (Şekil 2.7) [21, 22]. 2000 yılından günümüze diyabet mortalite oranlarında çarpıcı bir artış görülmektedir [20-22].

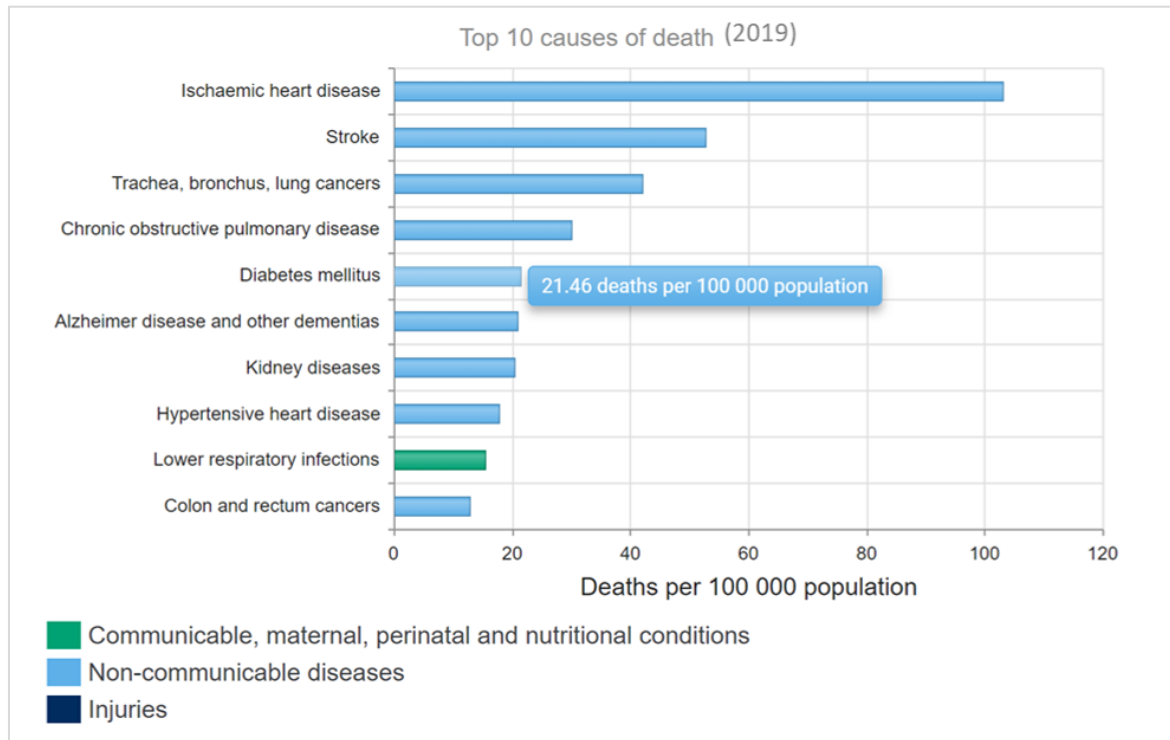


Şekil 2.7. Küresel ölüm nedenleri [22].

Dünya genelindeki diyabet mortalite artışına paralel olarak Türkiye'deki ölüm oranlarında da artış gözlenmiştir [20, 23, 24]. 2000 yılında diyabetin neden olduğu ölüm oranı 100 000'de 19,12 iken 2019 yılında bu sayı 21,46'ya ulaşmıştır (Şekil 2.8 ve Şekil 2.9) [23]. 2000 yılında ilk 10 ölüm nedeni içerisinde 6. sırada olan diyabet, 2019 yılında 5. sıraya yükselmiştir [23].



Şekil 2.8. 2000 yılında Türkiye’deki ilk 10 ölüm nedeni [23].



Şekil 2.9. 2019 yılında Türkiye’deki ilk 10 ölüm nedeni [23].

IDF verilerine göre 2021 yılında Türkiye’de 60 yaş altı bireylerde diyabete bağlı ölüm oranı %4’tür [20, 24]. 2021’de yaklaşık 83 220 kişi diyabet dolayısıyla hayatını kaybetmiştir [20, 24].

## **2.2. Tip 2 Diyabet**

Tip 2 diyabet (T2DM), kalıtsal veya sonradan kazanılmış insülin direnci ile insülin salgısındaki bozukluklar dolayısıyla hiperglisemi gelişimiyle sonuçlanan kronik ve çok faktörlü bir hastalıktır [1-3, 25]. Tip 2 diyabetli bireylerde insülin üretimi yapılmaktadır ancak ya üretim yeterli düzeyde değildir ya da insülin direnci sebebiyle var olan insülin etkili bir şekilde kullanılamamaktadır [1, 9, 14]. Kanda devamlı olarak artan glikoz miktarı  $\beta$  hücrelerinin daha fazla insülin üretmesine yol açmaktadır, zamanla tahrip olan  $\beta$  hücrelerinde fonksiyon bozuklukları ortaya çıkmaktadır [3, 14, 18, 26].

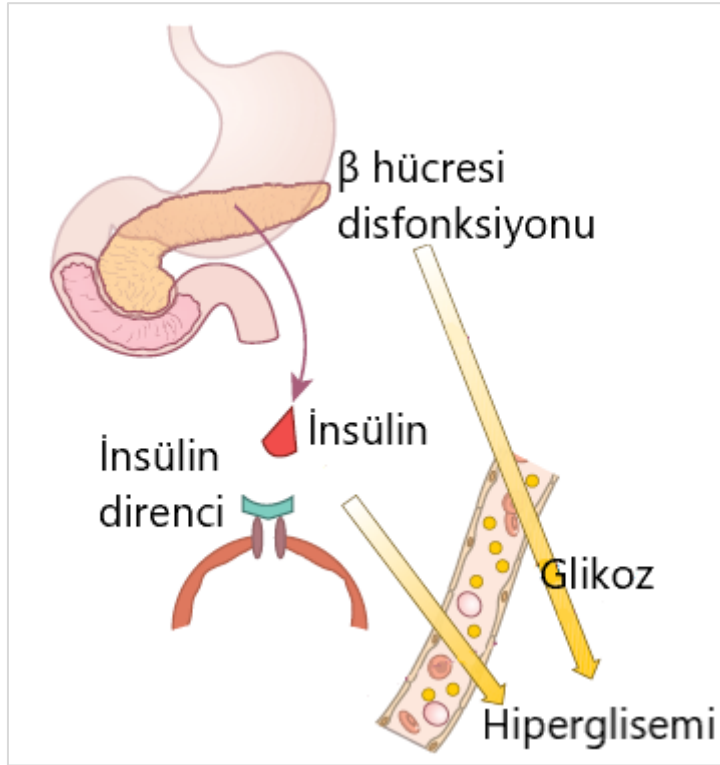
### **2.2.1. Tip 2 diyabetin epidemiyolojisi**

Küresel diyabet prevalansının her geçen yıl hızlı bir şekilde artması büyük oranda en yaygın diyabet türü olan tip 2 diyabetin artışından kaynaklanmaktadır [2, 3]. Tip 2 diyabetin yaygınlaşması nüfus artışı, yaşlanan nüfus, artan insidans, hastalığın daha erken başlangıç yaşı, tip 2 diyabette daha uzun süre hayatta kalma ve gelişmiş tanı gibi nedenlerden meydana gelmektedir [2, 3]. Günümüzde artan yüksek kalorili (fast-food gibi şeker ve yağ oranı yüksek ürünler) gıda tüketimi, hareketsiz yaşam tarzı ve kentleşme ile bireylerin tip 2 diyabet geliştirme oranları artmıştır [3].

Diyabet hastası bireylerin 3’te 2’si kentsel alanlarda yaşamaktadır [2], 2021 yılında kentsel alanlarda yaşayan diyabet hastası kişilerin sayısı 360 milyon (prevalans %12,1) iken kırsal alanda yaşayanların sayısı yaklaşık 177 milyondur (prevalans %8,3) [1]. T2DM oranları kırsal bölgelere (%7,2) göre kentsel bölgelerde (%10,8) daha yüksektir [2]. Tip 2 diyabet prevalansının en yüksek olduğu bölgeler Batı Pasifik (IDF WP bölgesi), Orta Doğu ve Kuzey Afrika (IDF MENA bölgesi) ve Güney Doğu Asya’dır (IDF SEA bölgesi) (Şekil 2.4) [1]. En düşük diyabet prevalansının görüldüğü yerler ise Afrika (IDF AFR bölgesi) ve Avrupa (IDF EUR bölgesi) bölgeleridir (Şekil 2.4) [1]. Genellikle, büyüyen ekonomilere sahip ülkelerdeki (Çin ve Hindistan gibi) diyabet prevalansında büyük ölçekli artışlar olacağı öngörülmektedir [1, 3].

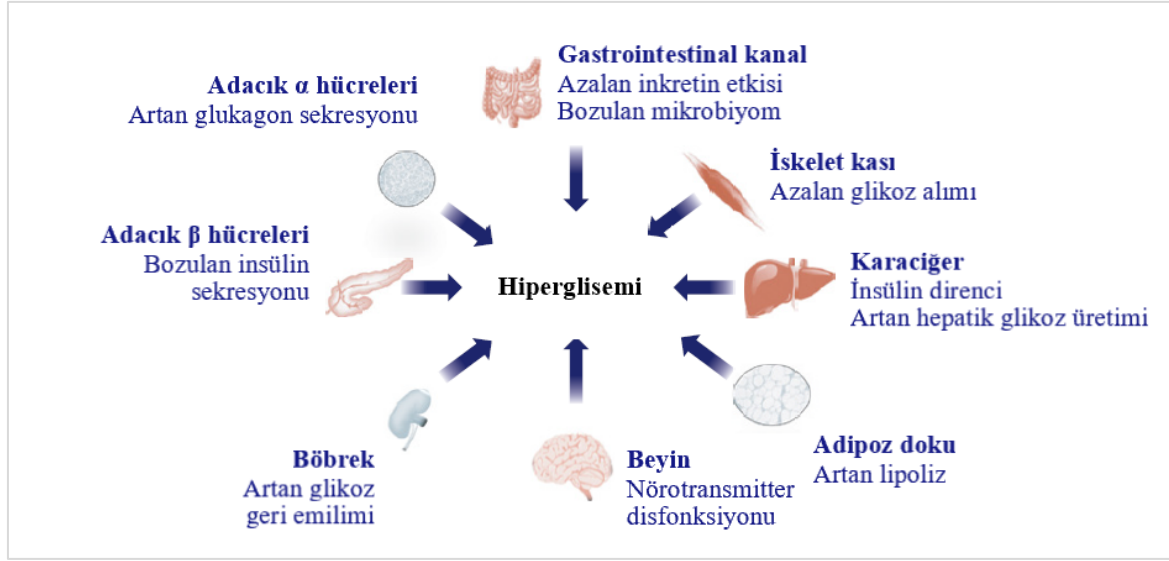
### 2.2.2. Tip 2 diyabetin patofizyolojisi

İnsülin direnci sebebiyle insülinin etkisinin azalması ve pankreas  $\beta$  hücrelerinin disfonksiyonuyla insülin sekresyonunun bozulması tip 2 diyabetin gelişiminde etkili olan başlıca patofizyolojik faktörlerdir (Şekil 2.10) [2, 3, 25-27].



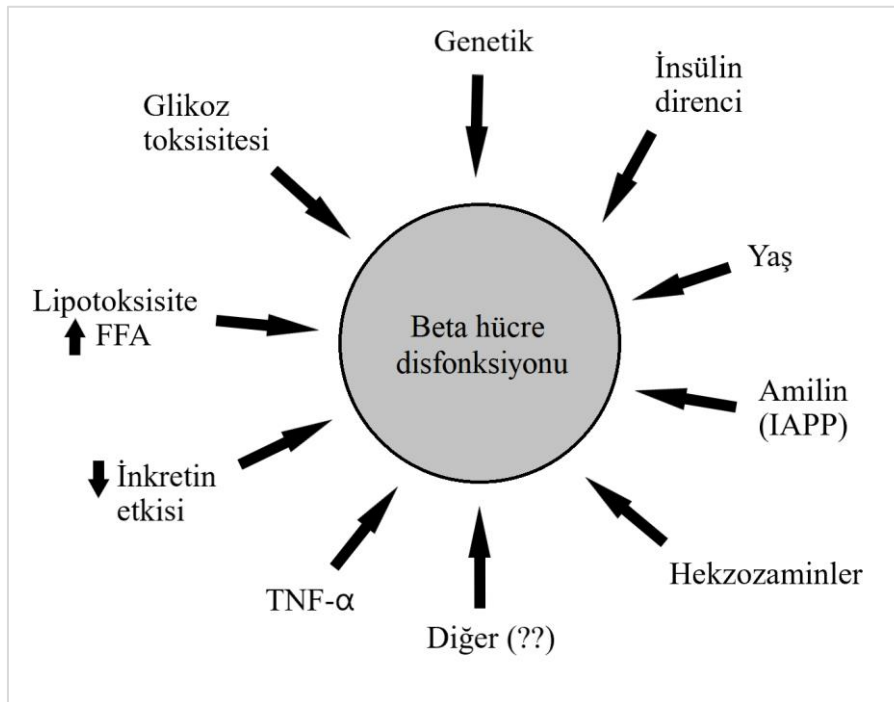
Şekil 2.10. Tip 2 diyabetin patofizyolojik faktörleri [9].

Kas ve yağ doku gibi periferik dokularda ve karaciğerde meydana gelen insülin direnci, kandaki glikozun kas hücreleri içerisine alımını azaltır, hepatik glikoz üretiminin inhibisyonunun bozulmasına yol açar ve adipositlerde kontrolsüz lipoliz ile serbest yağ asidi artışına neden olur (Şekil 2.11) [2, 9, 14, 27]. Adipositlerin disfonksiyonu inflamatuvarı tetikleyen adipositokinlerin salgılanmasına yol açar ve insülin direnci daha kötü bir hal alır [2, 3].



Şekil 2.11. Tip 2 diyabetin patofizyolojisi, hipergliseminin gelişmesine yol açan faktörler [2].

$\beta$  hücrelerindeki işlev bozukluğunun çok faktörlü, karmaşık bir etkileşim ağından kaynaklandığı düşünülmektedir [2, 26]. Tip 2 diyabette insülin sekresyonundaki bozulmalarda genetik, insülin direnci, yaş, amilin, heksozaminler, TNF- $\alpha$ , inkretin etkisi, lipotoksisite, glikoz toksisitesi gibi patogenetik faktörler rol oynamaktadır (Şekil 2.12) [14, 18].



Şekil 2.12. Beta hücresi disfonksiyonunda rol alan patogenetik faktörler [14].



Tip 2 diyabetli bireylerin  $\beta$  hücrelerindeki fonksiyonun %40-60'ını kaybettiği ve bu fonksiyon kaybının tanı yapıldıktan sonra da giderek arttığı gözlemlenmiştir [2]. Yüksek serbest yağ asidi konsantrasyonu ve hiperglisemi  $\beta$  hücrelerinin disfonksiyonuna neden olur (glikolipotoksisite) [2, 3, 26]. Aşırı beslenme ile artan oksidatif ve endoplazmik retikulum (ER) stres [2, 27], inflamasyon ve inflamatuvar stres gibi metabolik baskılara maruz kalmak  $\beta$  hücrelerinin fonksiyonunu olumsuz yönde etkiler, bu durum adacık hücrelerinin kaybına (apoptoz) yol açabilir [26, 27].

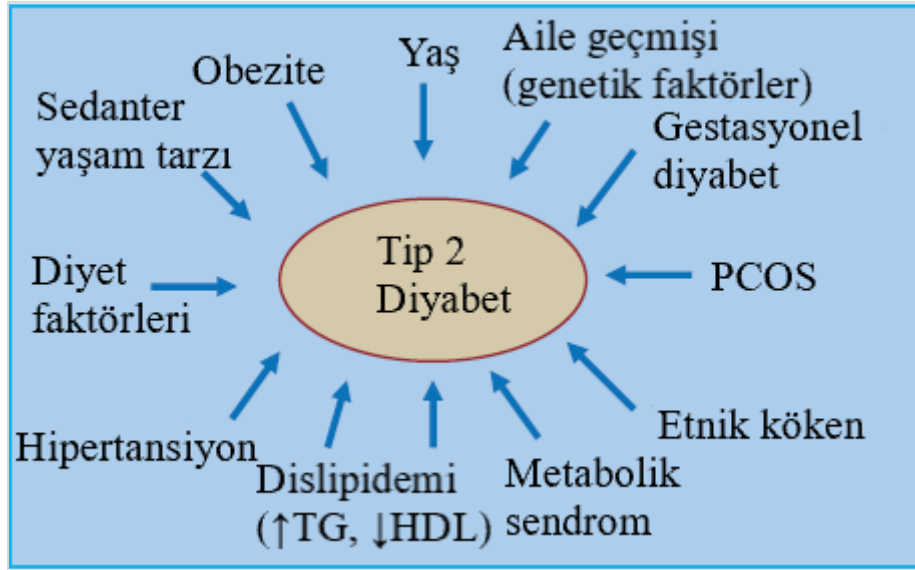
Vücutta insülin direnci geliştikçe, kandaki glikoz miktarının düzenlenmesi için  $\beta$  hücrelerindeki insülin sekresyonu artar [2, 3]. Fakat zaman geçtikçe  $\beta$  hücreleri maksimum seviyede insülin salgılama kapasitesine ulaşır, bu kronik stimülasyon  $\beta$  hücrelerine zarar verir ve insülin sekresyonu azalmaya başlar [2]. Pankreas  $\alpha$  hücrelerinin glukagon salınımı arttırması ile insülin/glukagon oranı (glikoz homeostazisi) bozulur, düzenleyici sinyal yollarının düzgün bir şekilde işlemlerini engellenir (Şekil 2.11) [2, 18, 26].

### **2.2.3. Tip 2 diyabetin semptomları**

Tip 2 diyabetli bireylerin çoğunda herhangi bir semptom görülmez (asemptomatik) veya semptomlar çok hafif seyreder [1, 17]. T2DM'de görülen semptomlar aşırı susuzluk, devamlı açlık hissi, sık idrara çıkma, yavaş iyileşen kesikler ve yaralar, yorgunluk, bulanık görüş ve ellerde veya ayaklarda uyuşukluk hissidir [1, 9, 25].

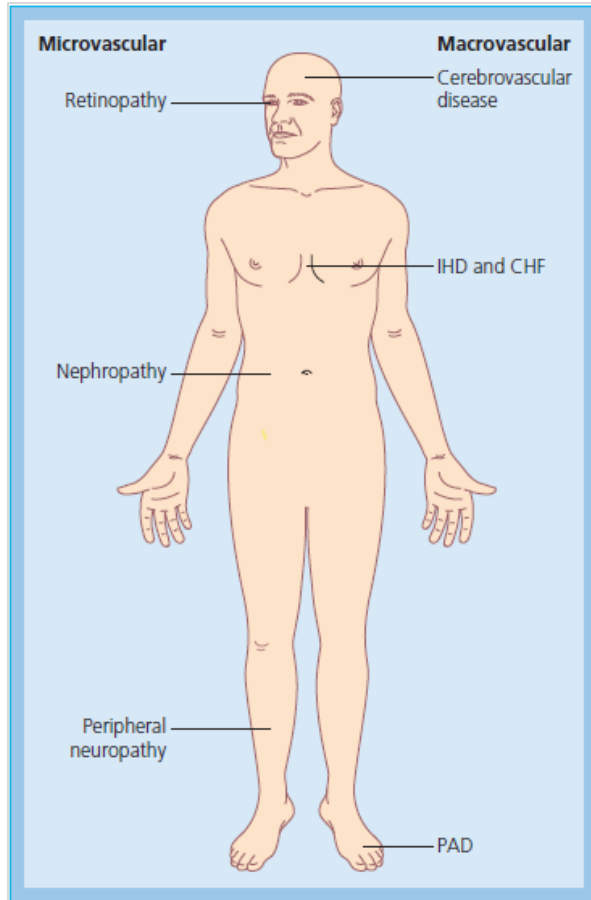
### **2.2.4. Tip 2 diyabetin risk faktörleri**

Tip 2 diyabetin risk faktörleri değiştirilemeyen (genetik) faktörler ve çevresel (potansiyel olarak değiştirilebilen) faktörler olarak iki gruba ayrılabilir [2, 28]. Değiştirilemeyen faktörler arasında genetik, ailede diyabet geçmişi (birinci derece yakın akraba), yaş, etnik köken, gestasyonel diyabet geçmişi, kardiyovasküler hastalıklar ve onların risk faktörleri, hipertansiyon, hiperlipidemi, polikistik over sendromu (PCOS) ve metabolik sendromlar gibi faktörler yer almaktadır (Şekil 2.13) [2, 3, 17, 25]. Aşırı kilo ve obezite, hareketsiz yaşam tarzı, sağlıksız beslenme (aşırı hayvansal yağ ve şeker içeren diyet), şehirleşme, sigara kullanımı, yeterince uymamak, depresyon ve çevresel toksinler potansiyel olarak değiştirilebilen çevresel faktörler arasında bulunmaktadır (Şekil 2.13) [2, 3, 17, 25].



Şekil 2.13. Tip 2 diyabetin gelişimindeki risk faktörleri [3].

#### 2.2.5. Tip 2 diyabet ve komplikasyonları



Şekil 2.14. Diyabetin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları [3]. IHD: iskemik kalp hastalığı, CHF: konjestif kalp yetmezliği, PAD: periferik arter hastalığı.

Diyabet hastalığındaki komplikasyonlar vasküler sistemdeki değişimler sonucu vücuttaki doku ve organların fonksiyonel ve yapısal olarak hasar görmesi ile ortaya çıkmaktadır [2, 3]. Bu komplikasyonlar mikrovasküler komplikasyonlar ve makrovasküler komplikasyonlar olarak iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.14) [3, 7]. Retina, böbrek ve sinirlerdeki arteriyoller ve kılcal damarları etkileyenler mikrovasküler komplikasyonlar olarak gruplandırılmıştır (Şekil 2.14) [2, 3]. Beyin, kalp ve alt ekstremitelerdeki (bacaklar ve ayaklar) arterleri etkileyenler ise makrovasküler komplikasyonlar olarak gruplandırılmıştır (Şekil 2.14) [2, 3].

### Mikrovasküler komplikasyonlar

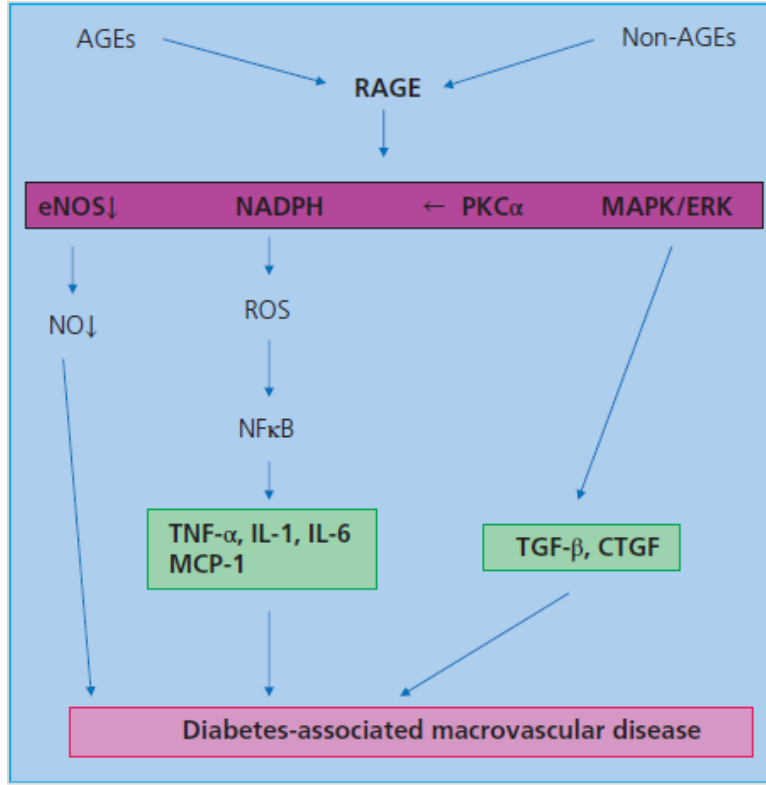
Yeni teşhis konulmuş tip 2 diyabetli kişilerin %20-50'sinde mikrovasküler komplikasyonlar görülür, bu durum hastalığın tanıdan çok daha önce geliştiğinin göstergesidir [2, 9]. Mikrovasküler komplikasyonlar, uzun süre hiperglisemiye maruz kalındığında oluşmaktadır [3, 14]. Mikrovasküler komplikasyonlar retina, böbrek ve sinirlerdeki kılcal damarlar ve arteriyollerin basal membranlarının kalınlaşması nedeniyle daralıp tıkanmaları sonucu ortaya çıkar [2, 3]. Retinopati, nefropati ve nöropati tip 2 diyabetin mikrovasküler komplikasyonları arasındadır [1-3, 7-9, 28-30]. Nöropati diyabet hastası olan bireylerin neredeyse %50'sinde görülmektedir (2020) [9, 29], periferik nöropati en yaygın şeklidir [9, 30]. Nefropati tip 2 diyabetli kişilerin yaklaşık %25-50'ini etkilemektedir (2020) [2, 9, 29, 30]. Diyabetik nefropati, uzun süreli diyabete sonucu böbrek fonksiyonlarının bozulması ile oluşur ve önemli ölçüde morbidite ve mortaliteye neden olur [2, 9, 30]. Dünyada çalışan yaş grubunda körlüğün en yaygın nedeni olan retinopati, tip 2 diyabetli hastaların yaklaşık %25'inde görülmektedir [2, 9, 29, 30].

Mikrovasküler komplikasyonların patogenezinin çok faktörlü olduğu düşünülmektedir [2, 30]. Hiperglisemi, hipertansiyon ve büyüme faktörleri/sitokinler gibi patogeneze faktörlerinin mikrovasküler komplikasyonlara yol açtığı düşünülmektedir [2, 3, 30]. Genetik polimorfizmlerin bu faktörlerle ilgili proteinlerin işlevleriyle ilişkisi olabilir ayrıca polimorfizmler bazı etnik ve genetik farklılıkların mikrovasküler komplikasyonlara olan yatkınlığını açıklamada yardımcı olabilir [2, 3].

### Makrovasküler komplikasyonlar

Diyabet hastası bireylerde makrovasküler komplikasyon riski diyabet hastası olmayan popülasyona göre önemli ölçüde yüksektir [3, 30]. Tip 2 diyabet hastalarının çoğunluğu dünya genelinde en yüksek mortaliteye sahip kardiyovasküler hastalıklara (CVD) (Şekil 2.7) maruz kalmaktadır [3, 9, 14, 22]. Diyabet hastalarında kardiyovasküler hastalıklar birincil ölüm nedendir, 65 yaş üzeri diyabetli bireylerdeki ölümlerin üçte ikisini kardiyovasküler hastalıklar oluşturmaktadır [2, 9, 30, 31]. Makrovasküler komplikasyonlar, arter duvarlarındaki daralmaya, yaralanmaya ve kronik inflamasyona yol açan ateroskleroz sonucu ortaya çıkar [9, 18, 32]. Tip 2 diyabetin makrovasküler komplikasyonları arasında koroner arter hastalığı (CAD), periferik arter hastalığı (PAD) ve serebrovasküler hastalıklar bulunmaktadır [1-3, 7-9, 28, 30-32].

Makrovasküler komplikasyonların patogenezinin birçok metabolik faktör içerdiği düşünülmektedir [3, 33]. Reaktif oksijen türleri (ROS), inflamatuvar sitokinler ve ileri glikasyon son ürünlerin (AGEs) üretiminin artışı gibi çeşitli moleküler mekanizmaların kronik hipergliseminin makrovasküler komplikasyonlar için oluşturduğu risk faktörleri arasında yer aldığı bilinmektedir [2, 3, 9, 33]. AGE ve AGE reseptörleri (RAGE) ateroskleroz patogenezinde önemli bir role sahiptir [3]. Hiperglisemi ile uyarılan ileri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) oluşumu vasküler endotel fonksiyona etki ederek inflamasyona ve vazokonstrüksiyona (damarların büzülmesi) neden olur [2, 3, 9, 18, 33]. Endoteyal hücrelerde bulunan ve inflamatuvar lezyonlarla ilişkilendirilmiş olan RAGE'in diyabetin makrovasküler komplikasyonları ile doğrudan ilgisi olduğu bilinmektedir [3]. AGE'in RAGE'e bağlanması sonucu NADPH oksidazın da içerisinde bulunduğu birçok sinyal yolağının aktivasyonu gerçekleşir (Şekil 2.15) [3]. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin makrovasküler komplikasyonların patogenezinde önemli rolü bulunmaktadır (Şekil 2.15) [3].



Şekil 2.15. AGE reseptörü (RAGE) aktivasyonunun diyabet ile ilişkili makrovasküler hastalıkların oluşumundaki rolü ve sinyal yolları [3].

Diyabetli bireylerde hipertansiyon, hiperlipidemi, obezite, aile geçmişi ve sigara kullanımı gibi faktörler diğer makrovasküler komplikasyon risk faktörleri arasında yer almaktadır [2, 30-32].

#### Türkiye’de mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar

Türkiye’deki diyabet hastalarında mikrovasküler komplikasyonlar daha sık görülmektedir [24]. Nöropati %14,9 prevalans ile en çok karşılaşılan mikrovasküler komplikasyondur, ardından %6,2 prevalansla retinopati ve %3,4 prevalansla nefropati gelmektedir (Şekil 2.16) [24]. Makrovasküler komplikasyonlarda ise koroner arter hastalığı %12,9 prevalans oranıyla ilk sırada yer almaktadır (Şekil 2.16) [24]. Diğer makrovasküler komplikasyonlardan olan kalp yetmezliği %2,1, serebrovasküler hastalıklar %1,5 ve periferik arter hastalığı %0,7 prevalansa sahiptir (Şekil 2.16) [24].

| Diyabetin komplikasyonları |                                                                     |                                                           |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Mikrovasküler              | Nefropati : %3,4<br>Nöropati : %14,9                                | Retinopati : %6,2                                         |
| Makrovasküler              | Koroner arter hastalığı : %12,9<br>Periferik arter hastalığı : %0,7 | Serebrovasküler hastalık : %1,5<br>Kalp yetmezliği : %2,1 |

Şekil 2.16. Türkiye’de mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların prevalansları (2021) [24].

### 2.2.6. Tip 2 diyabet ve genetik

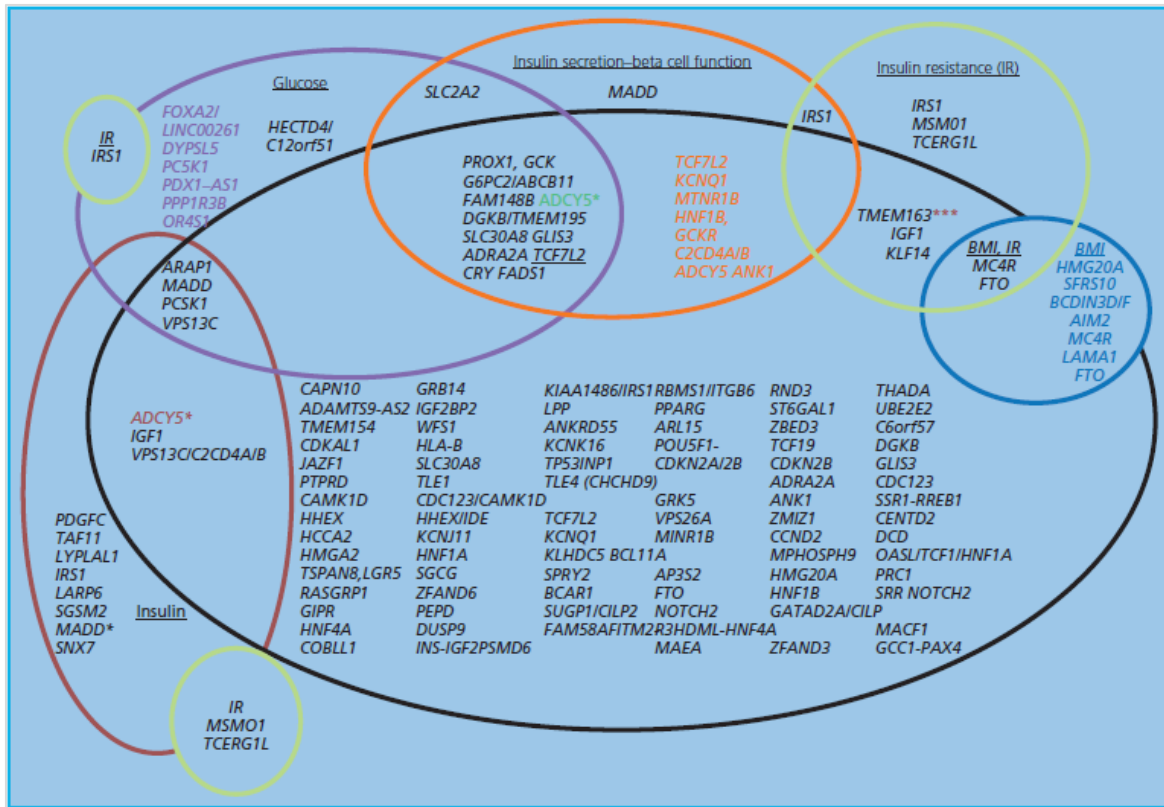
Tip 2 diyabet hastalığının genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerden etkilenecek şekilde geliştiği bilinmektedir ancak tip 2 diyabetin genetik risk faktörleri ve yapısı oldukça karmaşıktır [2, 3, 14, 34-36]. Yapılan farklı popülasyon, aile ve ikiz tabanlı çalışmalara göre kalıtımın %20 ile 80 arasında değişen oranlarda T2DM yatkınlığı oluşturduğu ve bu sebeple kalıtımın Tip 2 diyabet için çok önemli olduğu düşünülmektedir [2, 3, 9, 14, 34-36]. Tip 2 diyabet hastası bir ebeveyni olan bireylerin yaşamları boyunca tip 2 diyabet geliştirme riski %40 iken her iki ebeveynin de tip 2 diyabet hastası olması bu riski %70'lere çıkarmaktadır (Çizelge 2.1) [2, 3, 35, 36]. Tip 2 diyabet hastası olan anneye sahip bireylerin T2DM geliştirme riskleri tip 2 diyabet hastası olan babaya sahip bireylere göre daha yüksektir (Çizelge 2.1) [2, 14, 34, 36]. İkiz tabanlı çalışmalarda tek yumurta ikizlerinin tip 2 diyabet geliştirme uyumu %34 ile %100 varan oranlara sahiptir, çift yumurta ikizlerinde ise bu oran %20-30 civarında değişmektedir (Çizelge 2.1) [3, 7, 9, 14, 35, 36]. Çeşitli etnik gruplar arasında da genetik risk faktörlerine bağlı olduğu düşünülen büyük T2DM yaygınlık farklılıkları bulunmaktadır [3, 14, 18, 36].

Çizelge 2.1. Akraba yakınlığına göre Tip 2 diyabet geliştirme riskleri [2].

| Aile Üyeleri      | Tip 2 Diyabet Riski (%) |
|-------------------|-------------------------|
| Monozigot İkizler | ~70 (34-100)            |
| Dizigot İkizler   | 20-30                   |
| Kardeşler         | 10-15                   |
| Anne              | 15-40                   |
| Baba              | 15-30                   |
| Her İki Ebeveyn   | 70-75                   |
| Genel Popülasyon  | 6                       |

Tip 2 diyabet birden fazla genin etkisinin bulunduğu poligenik bir hastalıktır [2, 9]. Günümüze kadar genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), yeni nesil dizileme (NGS) ve tam genom dizileme (WGS) gibi çeşitli genotiplendirme yöntemleriyle genetik haritalamalar yapılmıştır ve tip 2 diyabet ile ilişkili 120’den fazla lokus tanımlanmıştır [3, 14, 18, 34-38].

Tip 2 diyabet hastalığının gelişimindeki yapı tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) ile ilişkilendirilmektedir [2, 3, 14, 18]. SNP, DNA dizisinde belirli bir pozisyondaki tek bir nükleotidin en yaygın bulunan genetik varyasyonudur, popülasyonun %1’inden fazlasında bulunur [3, 18]. Alellerdeki tek nükleotid değişimi ile karakterize olan tek nükleotid polimorfizmleri genotipleme için önemlidir ve fenotipik çeşitliğin yaklaşık %90’ından sorumludur [14, 18]. Tip 2 diyabet gelişimi ile ilişkili tanımlanan *CAPN10*, *TCF7L2* ve *CDKAL1* gibi birçok gen polimorfizmi bulunur (Şekil 2.17) [2, 3, 18, 34-37].



Şekil 2.17. Tip 2 diyabet ile ilişkili genetik varyantlar (Gen isimleri varyantları temsil etmektedir, varyantların konumları gen bölgesinde veya genin yakınındadır) [3].

## 2.3. Çalışmadaki Genler

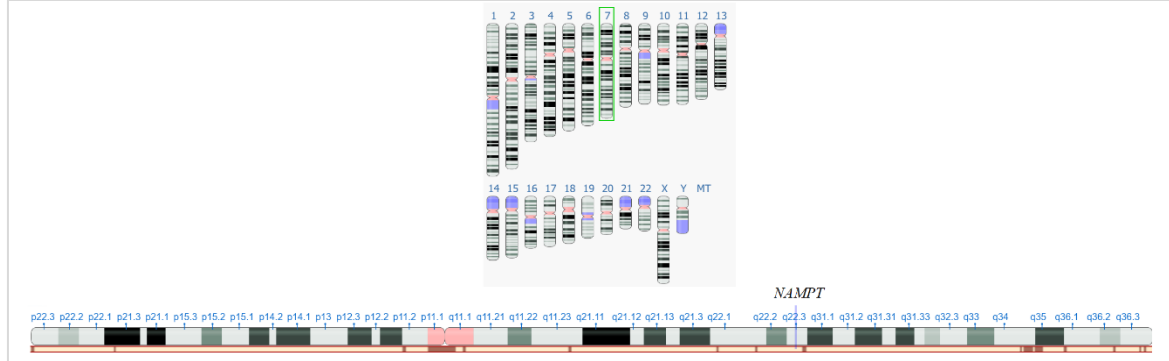
### 2.3.1. NAMPT Geni

Tam adı nikotinamid fosforibozil transferaz olan *NAMPT* geni 37590 baz büyüklüğündedir ve 13 ekzon ile 12 introndan oluşur (Çizelge 2.2) [4, 39-41].

Çizelge 2.2. *NAMPT* geni özellikleri [4].

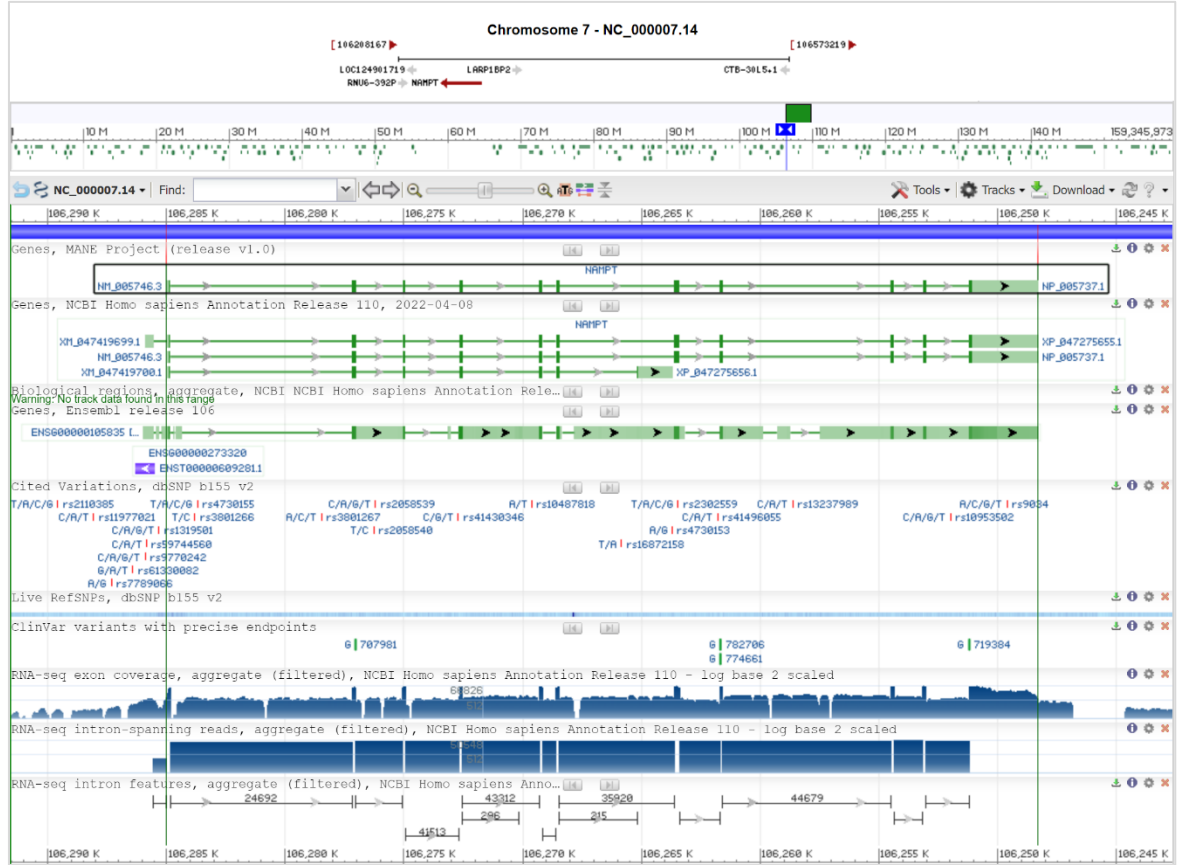
| Gen ID | Gen Sembolü | Gen Tipi        | Bulunduğu Kromozom | Lokasyonu (Aralığı)              | Ekzon sayısı |
|--------|-------------|-----------------|--------------------|----------------------------------|--------------|
| 10135  | NAMPT       | Protein Kodlama | 7                  | 7q22.3<br>(106248298..106285888) | 13           |

*PBEF1*, *PBEF* ya da *Visfatin* olarak da adlandırılan *NAMPT* geni kromozom 7 üzerinde bulunur (Şekil 2.18 ve Şekil 2.19) [4].



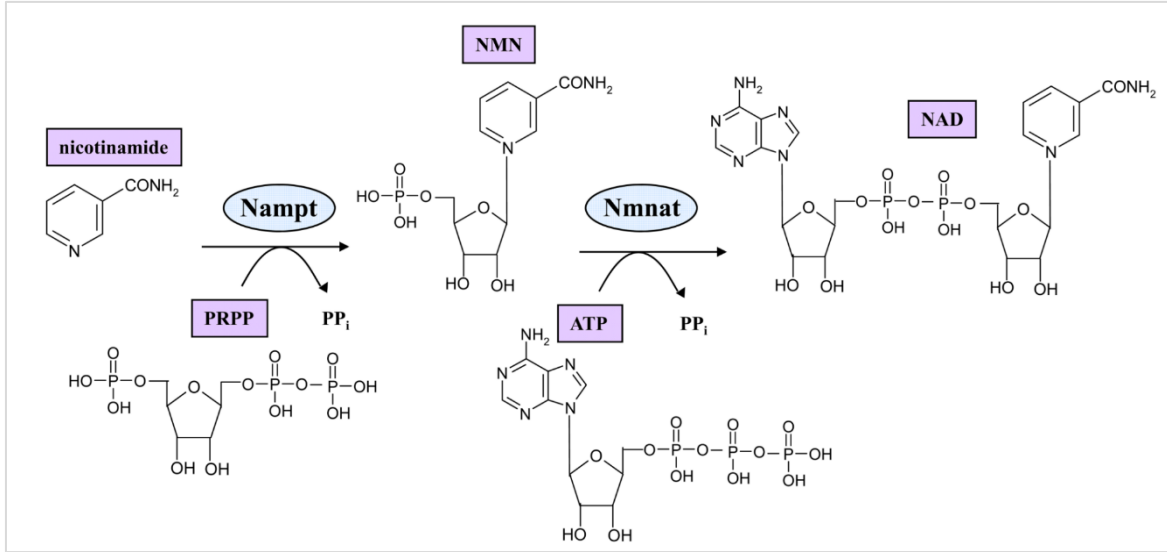
Şekil 2.18. Kromozom 7 üzerindeki *NAMPT* geninin konumu [39].





Şekil 2.19. Kromozom 7 üzerinde bulunan *NAMPT* geni [4].

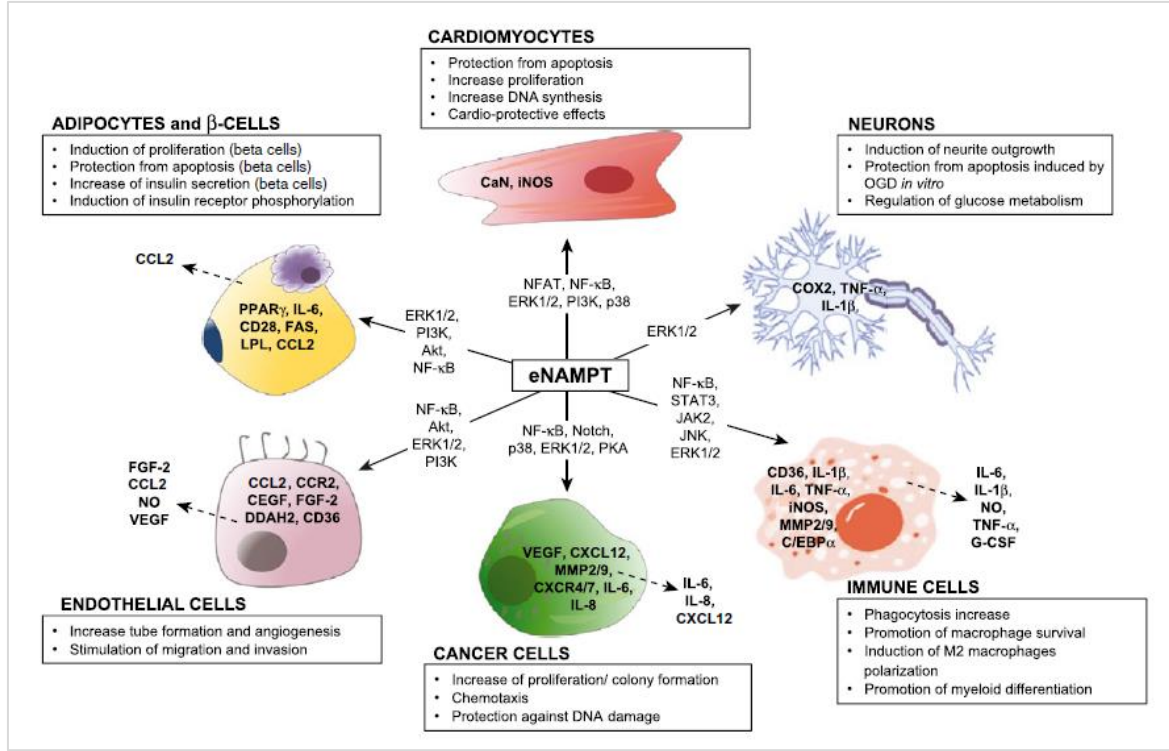
*NAMPT*, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) biyosentezinde bir ara ürün olan nikotinamid mononükleotidi (NMN) elde etmek için nikotinamidin (NAM) 5-fosforibosil-1-pirofosfat (PRPP) ile yoğunlaştırılmasını katalize eden bir proteini kodlayan genidir (Şekil 2.20) [4]. Nikotinik asit fosforibosiltransferaz (NAPRTase) ailesinden olan bu proteinin metabolizma, stres tepkisi ve yaşlanma gibi birçok önemli biyolojik süreçte rol oynadığı düşünülmektedir [4].



Şekil 2.20. NAD biyosentezi, NAMPT'nin katalizasyonu ile NAM'dan NMN edilmesi ve ardından NAD'a dönüştürülmesi [42].

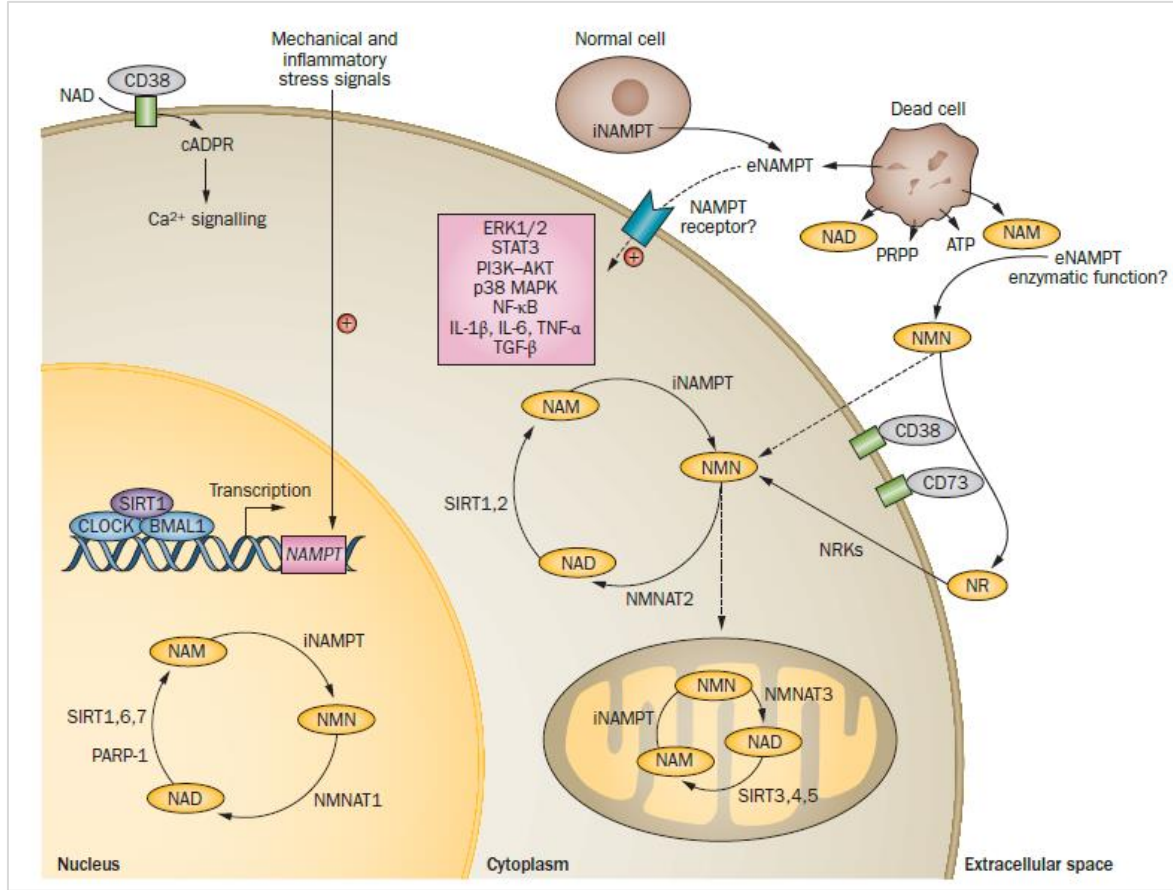
NAMPT geninin ürünü olan nikotinamid fosforibozil transferaz (NAMPT) birçok fonksiyonu olduğu düşünülen bir adipositokindir [42-49]. NAMPT memelilerde NAD biyosentezinde hız sınırlayıcı enzim olarak görev alır, kosubstrat olarak kullanılan PRPP ile birlikte NAM'ı NMN'ye dönüştürür ve doğrudan NAD sentezinin gerçekleşmesinde rol alır (Şekil 2.20) [42-45, 50-61].

NAMPT'nin memelilerde hücre içi (iNAMPT) ve hücre dışı (eNAMPT) iki farklı formu bulunur [44, 47, 48, 54, 55, 58, 59, 62-64]. Pre- $\beta$  hücresi koloni arttırıcı faktör (PBEF) veya visfatin olarak da bilinen eNAMPT adiposit ve  $\beta$  hücreleri gibi birçok hücre tipinde salgılanır ve farklı sinyal yollarında (IL-6 /STAT3, PI3K/AKT gibi) proinflamatuvar sitokin görevi görür (Şekil 2.21) [44, 47, 48, 56, 62]. Hücre dışı boşlukta bulunan eNAMPT  $\beta$  hücrelerinde insülin sekresyonunun artışı, apoptozdan korunma ve proliferasyon indüksiyonu sağlamaktadır (Şekil 2.21) [47].



Şekil 2.21. eNAMPT'in farklı hücre tiplerindeki sinyal yolları ve etkileri [47].

iNAMPT sitoz plazma, çekirdek ve mitokondri içerisinde bulunur [44, 48, 55]. Hücre içinde NAD biyosentezi iNAMPT tarafından katalize edilmektedir [47, 57, 59]. Artan NAD biyosentezinin metabolizma, yaşlanma ve strese karşı koruyucu etkileri olduğu düşünülmektedir [44]. iNAMPT ve eNAMPT'ın memeli hücresinde rol aldığı sinyal yolları Şekil 2.22'de verilmiştir.

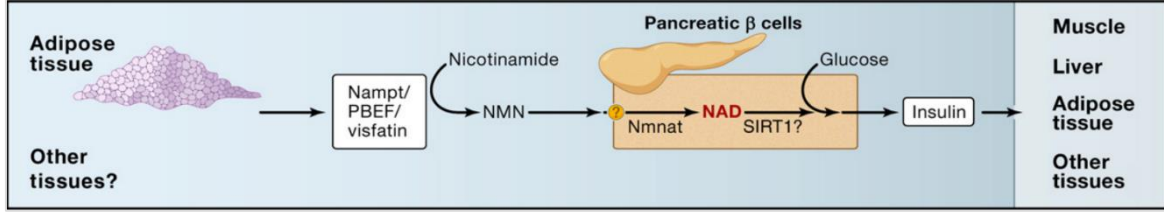


Şekil 2.22. iNAMPT ve eNAMPT’ın hücrede görev aldığı sinyal yolları [48].

### Tip 2 diyabet ve NAMPT

NAMPT’ın tip 2 diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıkların patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir [43-49, 53, 57, 60, 62-64]. Pankreas hücrelerindeki normal glikoz uyarımı ile gerçekleşen insülin sekresyonunda (GSIS) NAMPT’ın doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir (Şekil 2.23) [43, 48, 57, 63]. Adipositlerden salgılanan eNAMPT’ın β hücrelerinde fonksiyonun düzenlenmesinde görev aldığı düşünülmektedir [43, 47, 57, 60, 61, 63]. NAMPT’ın insüline benzer etkileri ile insülin reseptörüne bağlanma sonucu gerçekleşen etkileşimin diyabetin patogenezinde rol alabileceğini düşündürmektedir [44, 53, 63]. Yapılan birçok çalışma NAMPT seviyelerindeki değişimin tip 2 diyabet için risk faktörü oluşturduğunu ve aralarında bir korelasyon olduğunu göstermektedir, NAMPT düzeyindeki değişiklikler ile insülin sekresyonunun ve β hücrelerinin fonksiyonun azalması ve insülin direncinin artması gibi etkiler görülmektedir [43-46, 48, 49, 57, 60, 64]. Hem obez hem de obez olmayan tip 2 diyabet hastalarında artan NAMPT düzeyinin artan IL-6 seviyeleri ile de korelasyona sahip olduğu bilinmektedir [45]. NAMPT genindeki farklı polimorfizmlerin tip

2 diyabet ve tip 2 diyabet ile ilişkilendirilmiş komplikasyonlar (kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon gibi) ile arasında olası bir ilişki olduğu düşünülmektedir [46-49].



Şekil 2.23. Pankreas hücrelerindeki insülin salınımının NAMPT tarafından düzenlenmesi [43].

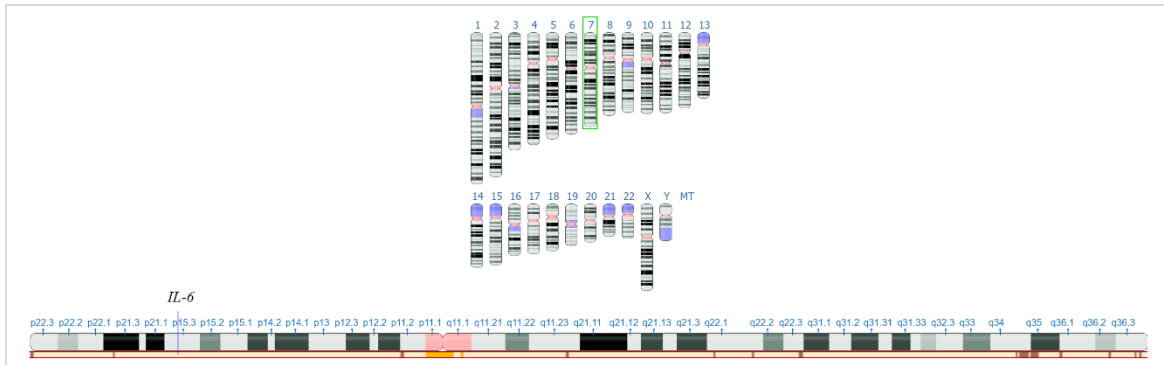
### 2.3.2. IL-6 Geni

Tam adı interlökin-6 olan *IL-6* geni 4798 baz büyüklüğündedir ve 5 ekzon ile 4 introndan oluşur (Çizelge 2.3) [5, 65-67].

Çizelge 2.3. *IL-6* geni özellikleri [5].

| Gen ID | Gen Sembolü | Gen Tipi        | Bulunduğu Kromozom | Lokasyonu (Aralığı)            | Ekzon sayısı |
|--------|-------------|-----------------|--------------------|--------------------------------|--------------|
| 3569   | IL6         | Protein Kodlama | 7                  | 7q15.3<br>(22727200..22731998) | 5            |

*IL-6* geni kromozom 7 üzerinde yer alır ve inflamasyon ile B hücrelerinin olgunlaşmasında işlev gören bir sitokini kodlar (Şekil 2.24 ve Şekil 2.25) [5]. Genel olarak akut ve kronik inflamasyon bölgelerinde üretilen bu protein serum içerisine salgılanır ve transkripsiyonel bir inflamatuvar yanıtı indükler (interlökin 6 reseptörü (IL-6R) yoluyla) [5].

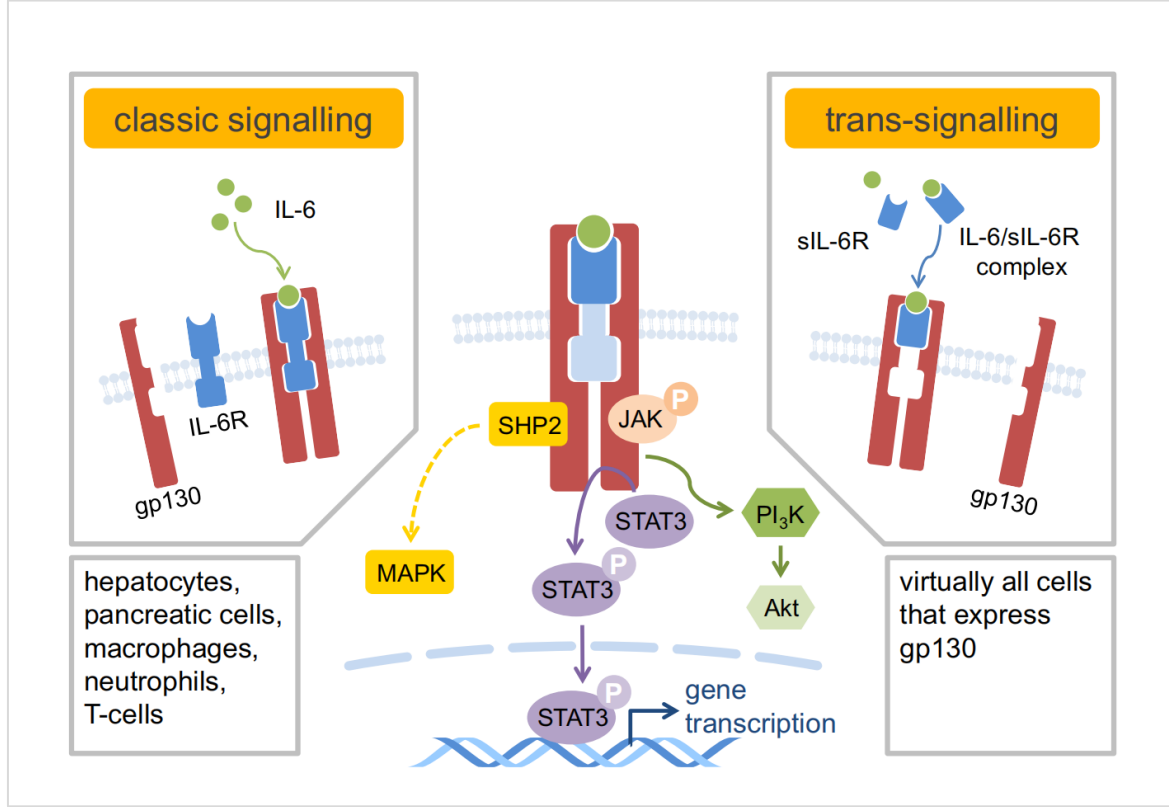


Şekil 2.24. Kromozom 7 üzerindeki *IL-6* geninin konumu [65].

*IL-6* geninin ürünü olan interlökin-6 (IL-6) pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar özelliklere sahip çok işlevli bir adipositokindir [68-81]. Lenfosit (T ve B hücreleri), endotel hücresi, iskelet kas hücresi ve adiposit gibi çeşitli hücreler tarafından salgılanan IL-6'nın inflamasyon, immün yanıt, metabolizma, proliferasyon, farklılaşma süreçlerinin düzenlenmesinde rolü bulunur [68-75, 78]. B hücrelerinin antikör üretimini sağlayan faktördür [68]. Ayrıca COVID-19 gibi viral enfeksiyon hastalıklarında da yüksek IL-6 seviyeleri gözlemlenmektedir [5].

IL-6 tarafından stimüle edilen klasik ve trans-sinyalizasyon olarak adlandırılan farklı sinyal yolları bulunur (Şekil 2.26) [70, 71, 80]. Klasik sinyalizasyon IL-6'nın membran üzerinde bulunan IL-6R'ya bağlanması ile gerçekleşir [70, 71, 80]. IL-6R özellikle hepatositler, pankreas adacık hücreleri ve T hücreleri gibi birkaç hücre tipinin membranına bağlıdır ve burada ifade edilir [71]. Trans-sinyalizasyon, çözünür formda bulunan IL-6R (sIL-6R) ile gerçekleşir [70, 71, 80]. IL-6, sIL-6'ya bağlanarak protein gp130 aracılığı ile sinyalizasyonu gerçekleştirir (Şekil 2.26) [70, 71, 80]. Sinyalizasyonda görev alan gp130 neredeyse her

hücre tipi tarafından ifade edilir [71]. Klasik sinyalizasyonun uyarılması anti-inflamatuvar yanıtı tetiklerken, trans-sinyalizasyon pro-inflamatuvar yanıtın gelişmesine neden olur [80].

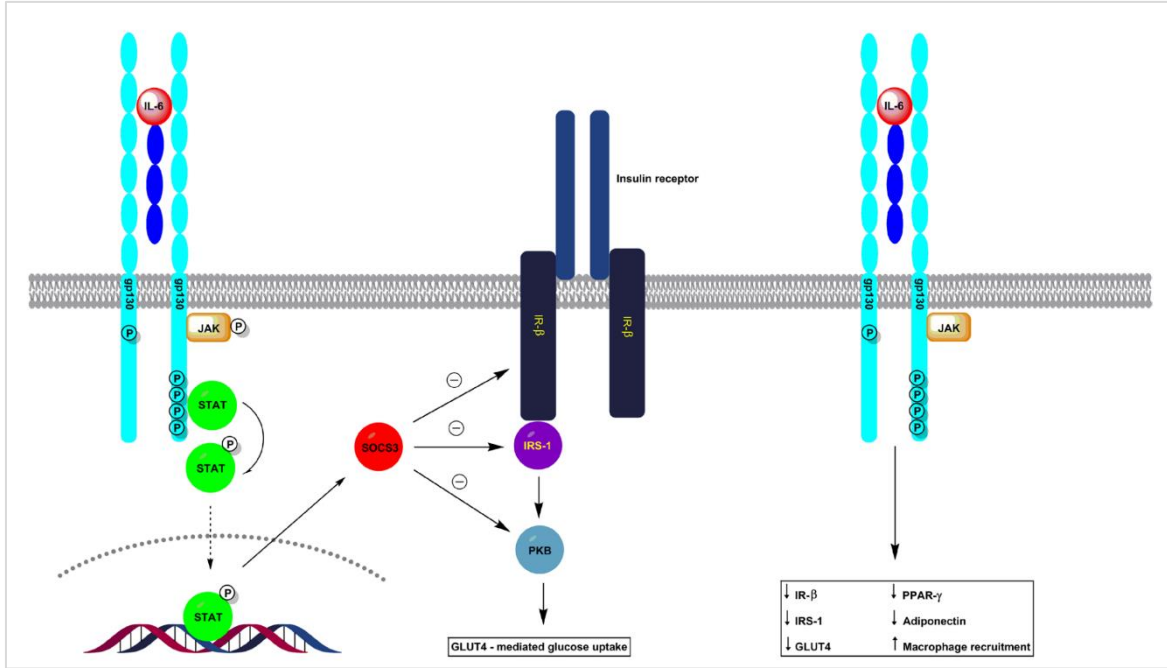


Şekil 2.26. IL-6 hücre içi sinyal yolları, klasik sinyalizasyon ve trans-sinyalizasyon [71].

### Tip 2 diyabet ve IL-6

IL-6'nın tip 2 diyabetin patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [5, 70-72, 74, 78, 81-84]. Aynı zamanda obezite, hiperlipidemi, hiperglisemi ve kardiyovasküler hastalıkların gelişimi ile ilişkisi olduğu düşünülen IL-6 kas hücreleri, hepatositler ve pankreas  $\beta$  hücrelerine etki ederek doğrudan ya da dolaylı yoldan glukoz homeostazını ve metabolizmasını etkilemektedir [70, 81-84]. Kronik düşük dereceli inflamasyon insülin direnci ve tip 2 diyabet gelişimi için risk faktörü oluşturur ve bu durum T2DM hastalarında dolaşımdaki yüksek IL-6 seviyeleri ile kendini gösterir [70, 71]. Yüksek IL-6 konsantrasyonları insülin sekresyonunu baskılar, artan IL-6 ile pankreas adacık hücrelerinin fonksiyon kaybına neden olabilir [74]. Adipositler ve adipoz dokulardaki makrofajlar tip 2 diyabette dolaşımda bulunan yüksek IL-6 seviyelerinin temel kaynağıdır [70]. Bu inflamatuvar sitokin adipoz dokularda insülin direncine sebep olabilir (Şekil 2.27) [70].





Şekil 2.27. IL-6'nın adipositlerdeki insülin sinyalizasyonun düzenlenmesindeki rolü [70].

Yapılan bazı SNP çalışmalarında *IL-6* genindeki polimorfizmlerin T2DM ve onun komplikasyonları ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [74, 81, 83].

### 2.3.3. Vaspin Geni

*SERPINA12* olarak da bilinen ve tam adı serpin aile A üyesi 12 (serpin family A member 12) olan *Vaspin* geni 30565 baz büyüklüğündedir ve 8 ekzon ile 7 introndan oluşur (Çizelge 2.4) [6, 85-87].

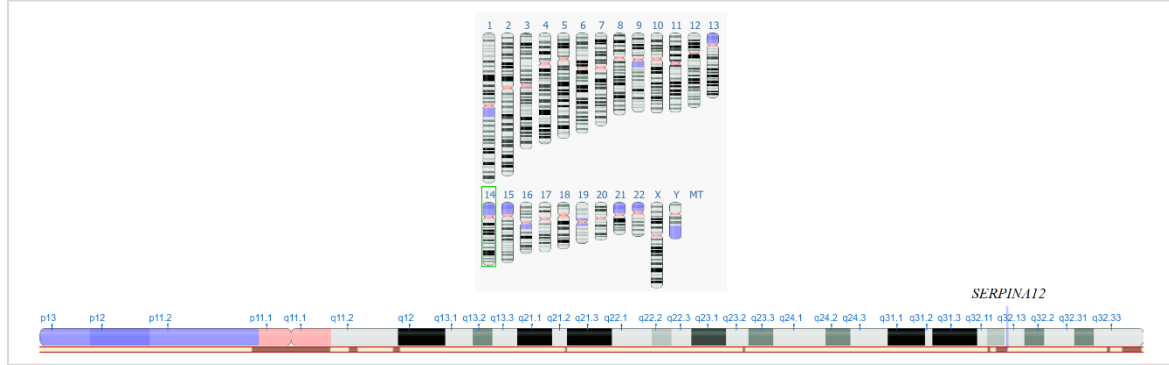
Çizelge 2.4. *Vaspin* geni özellikleri [6].

| Gen ID | Gen Sembolü | Gen Tipi        | Bulunduğu Kromozom | Lokasyonu (Aralığı)              | Ekzon sayısı |
|--------|-------------|-----------------|--------------------|----------------------------------|--------------|
| 145264 | SERPINA12   | Protein Kodlama | 14                 | 14q32.13<br>(94487279..94517844) | 8            |

*Vaspin* geni kromozom 14 üzerinde bulunur ve bir sitokin kodlar (Şekil 2.28 ve Şekil 2.29) [6, 88]. *Vaspin* (viseral yağ dokusu kaynaklı serpin) serpin proteaz inhibitör ailesine ait insülin duyarlaştırıcı ve anti-inflamatuar etkileri olan bir adipositokindir [88-99]. Glukoneogenezin negatif regülasyonunda ve lipid metabolik sürecin düzenlenmesinde rol



aldığı düşünülmektedir [6]. Vaspin ilk olarak tip 2 diyabetli abdominal obez bir hayvan modelinde (OLEFT) beyaz yağ dokularda keşfedilmiştir [89-91, 93, 94, 96, 98, 100].



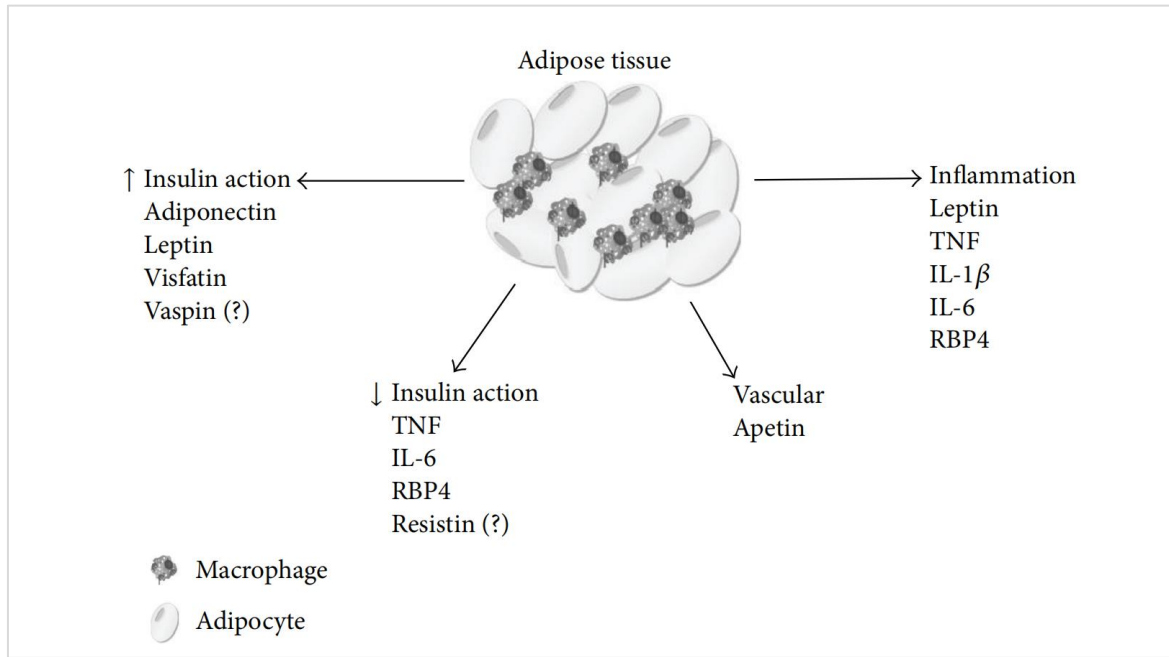
Şekil 2.28. Kromozom 14 üzerindeki *SERPINA12* geninin konumu [85].



Şekil 2.29. Kromozom 14 üzerinde bulunan *Vaspin* geni [6].

### Tip 2 diyabet ve Vaspin

Vaspin'in tip 2 diyabet ve obezite ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [98, 101-106]. Obezite ve T2DM hastalarında serum vaspin seviyelerinin yüksek olduğu bilinmektedir [98, 101, 103, 104, 106]. Ayrıca insan adipoz dokusu tarafından vaspin mRNA ekspresyonunun indüklenmesinin obezite, glikoz toleransı ve insülin duyarlılığına karşı telafi edici bir mekanizma oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2.30) [98, 101, 106].



Şekil 2.30. Adipoz dokudan salgılanan vaspinin insülin direnci ile ilişkisi [101].

Yapılan farklı çalışmalarda mikrovasküler komplikasyonlara sahip T2DM hastalarda serum vaspin seviyelerinin mikrovasküler komplikasyonları olmayan T2DM hastalarına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir [102, 105].

## 2.4. Çalışmadaki Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP)

### 2.4.1. *NAMPT* geni ve SNP'leri

#### rs61330082 (G>A)

rs61330082 SNP'i bir akış yukarı transkript varyantıdır [107] ve promotor bölgesinde bulunur [108]. Dünya genelinde G alleli 0,789 ve A alleli 0,211 genetik varyasyon yaygınlığına sahiptir [107]. Avrupa popülasyonunda referans allel olan G allelinin genetik varyasyon yaygınlığı 0,757 iken alternatif (dönüşümlü) allel olan A allelinin genetik varyasyon yaygınlığı 0,243'tür [107].

#### rs2058539 (C>A)

rs2058539 SNP'i *NAMPT* genindeki intron varyantıdır [109]. Dünya genelinde C alleli 0,443, A alleli 0,557 ve T alleli 0,0005 genetik varyasyon yaygınlığına sahiptir [109]. Avrupa popülasyonunda referans allel olan C allelinin genetik varyasyon yaygınlığı 0,459 iken alternatif (dönüşümlü) allel olan A allelinin genetik varyasyon yaygınlığı 0,541'dir [109]. Bir diğer alternatif allel olan T alleli ise 0,00009 gibi bir genetik varyasyon yaygınlığına sahiptir [109].

### 2.4.2. *IL-6* geni ve SNP'leri

#### rs2069860 (A>T)

rs2069860 (D162V) yanlış anlamlı (missense) varyanttır [110]. Dünya genelinde A alleli 0,993 ve T alleli 0,007 genetik varyasyon yaygınlığına sahiptir [110]. Avrupa popülasyonunda referans allel olan A allelinin genetik varyasyon yaygınlığı 0,992 iken alternatif (dönüşümlü) allel olan T allelinin genetik varyasyon yaygınlığı 0,008'dir [110].

#### rs1554606 (T>G)

rs1554606 SNP'i *IL-6* genindeki intron varyantıdır [111]. Dünya genelinde T alleli 0,417 ve G alleli 0,583 genetik varyasyon yaygınlığına sahiptir [111]. Avrupa popülasyonunda

referans allel olan T allelinin genetik varyasyon yaygınlığı 0,434 iken alternatif (dönüşümlü) allel olan G allelinin genetik varyasyon yaygınlığı 0,566'dır [111].

### 2.4.3 *Vaspin* geni ve SNP'leri

#### rs77060950 (G>T)

*Vaspin* geninin rs77060950 SNP'i intron varyantıdır [112]. Dünya genelinde G alleli 0,973 ve T alleli 0,027 genetik varyasyon yaygınlığına sahiptir [112]. Avrupa popülasyonunda referans allel olan G allelinin genetik varyasyon yaygınlığı 0,988 iken alternatif (dönüşümlü) allel olan T allelinin genetik varyasyon yaygınlığı 0,012'dir [112].

#### rs2236242 (T>A)

rs2236242 SNP'i *Vaspin* genindeki intron varyantıdır [113]. Dünya genelinde T alleli 0,650 ve A alleli 0,350 genetik varyasyon yaygınlığına sahiptir [113]. Avrupa popülasyonunda referans allel olan T allelinin genetik varyasyon yaygınlığı 0,600 iken alternatif (dönüşümlü) allel olan A allelinin genetik varyasyon yaygınlığı 0,400'dür [113].

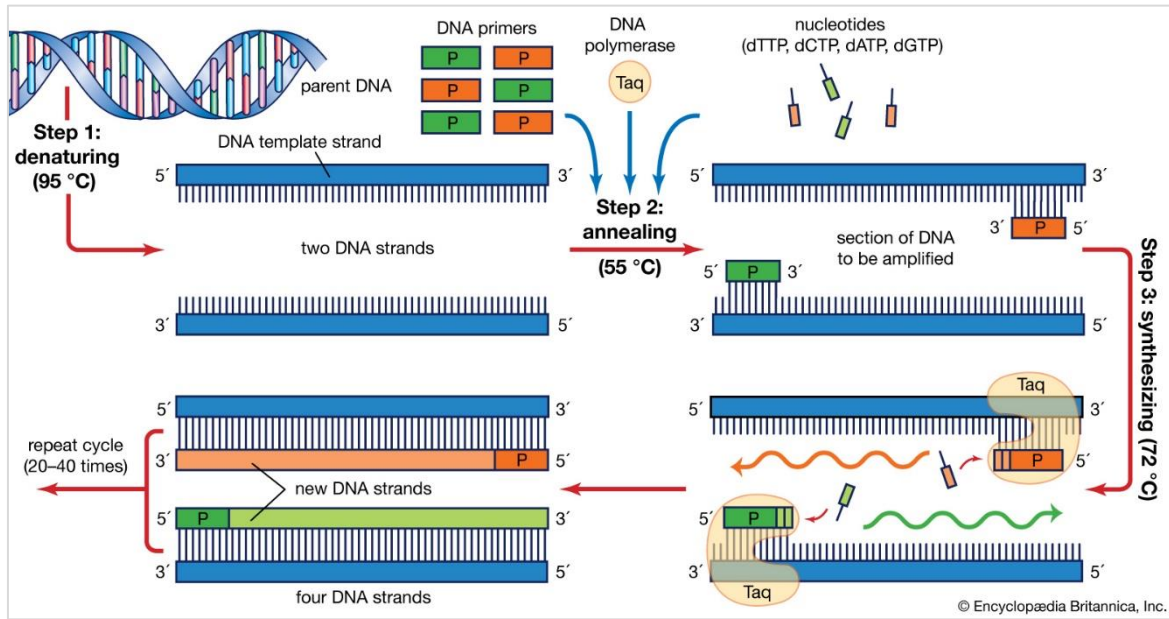
## 2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP)

### 2.5.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) DNA içerisinde bulunan özgün bir bölgeyi forward ve reserve primerlerin kullanımı ile birlikte enzimatik olarak çoğaltmak için kullanılan bir tekniktir [114-116]. PCR'da denatürasyon, hibridizasyon ve uzatma olmak üzere 3 temel adım bulunur (Şekil 2.31) [114-117]. İlk adım olan denatürasyonda DNA zinciri yaklaşık 90-95 °C'lik ısıyla birbirinden ayrılır ve tek iplik halini alır (Şekil 2.30) [117-119]. İkinci adım hibridizasyonda sıcaklık 40-60 °C'ye düşürülür ve bu adımda primerler DNA ipliklerine uygun bölgelerden bağlanır (Şekil 2.30) [117-119]. Üçüncü adım olan uzatmada sıcaklık 72 °C'e yükseltilir ardından DNA polimeraz (en yaygın kullanılan Taq polimeraz) yüksek sıcaklıkta primerlerin uçlarına nükleotidler (dNTP) ekleyerek uzatmayı gerçekleştirir

(Şekil 2.30) [117-119]. Yaklaşık 5 dakika kadar süren bu süreç genellikle 25 ile 35 döngü şeklinde tekrar eder ve PCR ürünü oluşur (Şekil 2.31) [117-119].

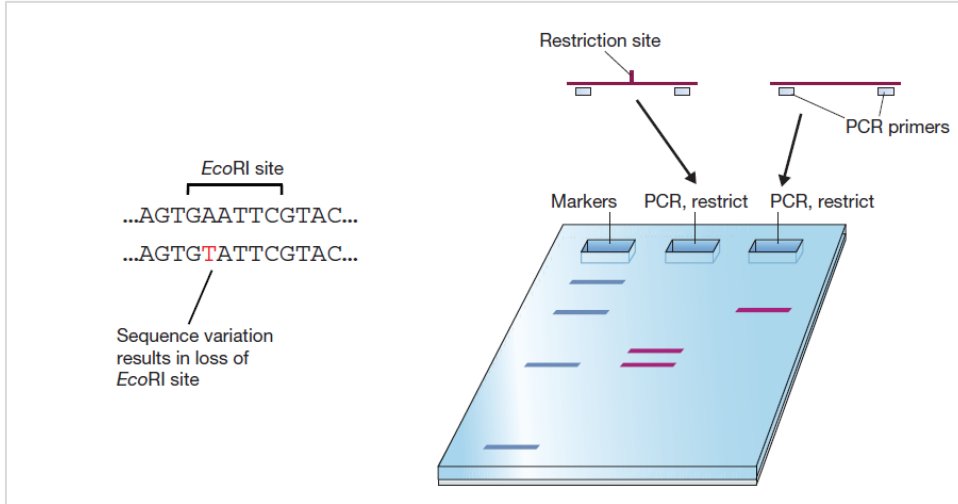
Polimeraz zincir reaksiyonunu gerçekleştirmek için gerekli olan reaktifler şablon DNA, forward ve reverse primerler, dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), termostabil DNA polimeraz, kullanılacak DNA polimeraza özel buffer, steril su ve magnezyumdur ( $Mg^{2+}$ ) [120].



Şekil 2.31. Polimeraz zincir reaksiyonu ve adımları [121].

## 2.5.2. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) homolog DNA dizisinin spesifik restriksiyon endonükleaz enzimleri ile sindirilmesi sonucu farklı uzunluklarda fragmanlar elde edilmesi ile gerçekleşen ve varyasyonlardan yararlanan tekniktir [122]. Restriksiyon endonükleaz enzimleri, DNA'da bulunan spesifik dizileri keser ve parçalara ayırır (Şekil 2.32) [122]. Parçalara ayrılmış DNA örnekleri incelenmek üzere jelle yüklenip jel elektroferezi yöntemi ile yürütülür (Şekil 2.32) [122]. Restriksiyon bölgesindeki bir mutasyon sonucu ortaya çıkan değişim ve dolayısıyla farklı büyüklüklere bölünen DNA parçaları bireyler arasındaki fragment farklarını belirtir [122, 123].



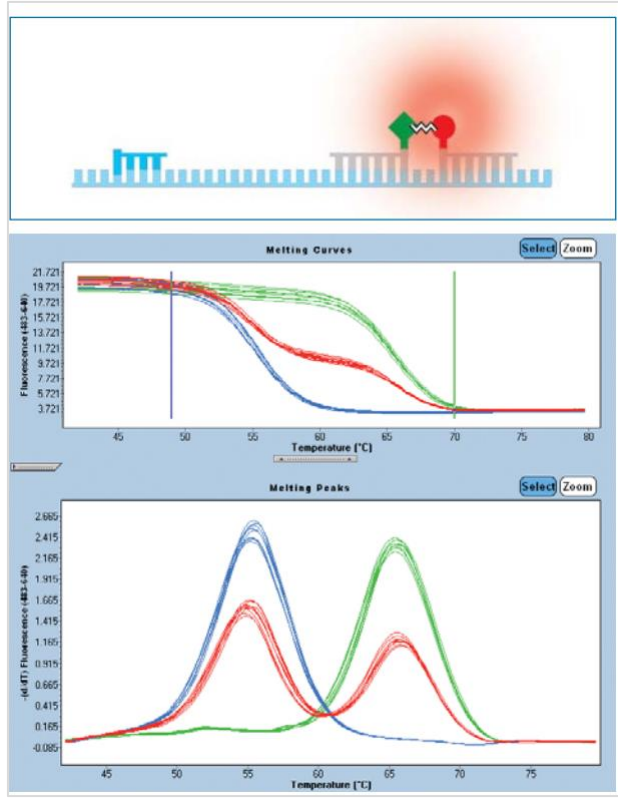
Şekil 2.32. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi [123].

PCR-RFLP popülasyon polimorfizmlerinin tanımlanmasında (genotiplendirme gibi varyasyon analizleri), genetik hastalıkların teşhisinde ve genom haritalamada kullanılır [122].

## 2.6. Real-Time PCR (qPCR) ve LightSNiP Assay

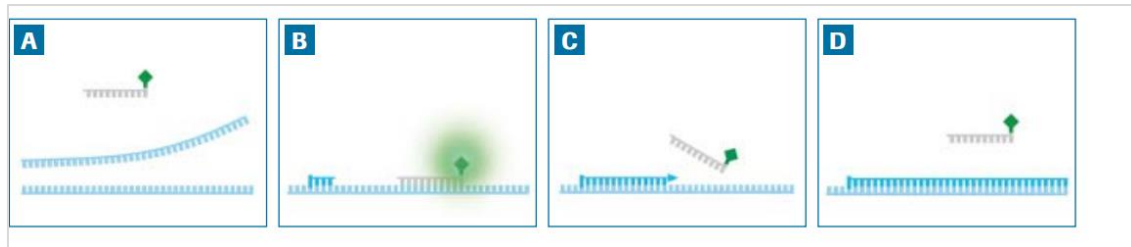
Real-Time PCR standart PCR tekniğinin gerçek zamanlı gerçekleştirilen halidir [124, 125]. DNA'nın eşzamanlı olarak amplifikasyonun ve kantifikasyonunun gerçekleştirildiği bir tekniktir [124, 125]. DNA dizisine özgü primerler kullanılarak spesifik bölge kopyalanır ve floresan prob ile floresan ölçümü gerçek zamanlı şekilde gerçekleşir [124, 125].

LightSNiP Assay SNP genotiplemesi için kullanılan bir yöntemdir ve tanısal yarar sağlamaktadır [126, 127]. LightSNiP Assay'in belirli tek nükleotid polimorfizmleri için üretilen spesifik problemler ile yapılan erime eğrisi analizi ile yabancıl tip (WT), homozigot ve heterozigot genotiplere özel erime noktalarını belirleyerek polimorfizm analizi gerçekleştirilir ve varyasyonları belirlemek kolaylaşır [127]. Erime eğrisi analizi hedef tanımlayıcı dizilere bağlanan floresan etiketli oligonükleotit problemlerin diziyeye özgü bağlanmasına dayanır (Şekil 2.33) [128]. Proba bağlanan bölgedeki SNP'in referans alleli yerine alternatif allel bulunuyorsa prob-hedef hibriti kararsız hale gelir ve prob ile tam eşleşen dizi arasındaki hibride göre daha düşük bir sıcaklıkta erime gerçekleşir ve bu durum genotipleme için çok kullanışlı ve spesifikliği yüksek bir tekniktir (Şekil 2.33) [128].



Şekil 2.33. Floresan etiketli probalar ile erime eğrisi analizi [128].

LightSNiP Assay’de kullanılan SimpleProbe problemleri, hibridizasyon problemlerinin özel bir türüdür [128]. SimpleProbe’da kovalent olarak bağlanmış bir boya taşıyan tek bir prob bulunur ve bu tek prob spesifik olarak hedef diziye hibritlenir (Şekil 2.34) [128]. Prob hibridize edildikten sonra hedef diziye hibridize edilmemiş halinden daha fazla floresan ışık yayar [128].



Şekil 2.34. SimpleProbe çalışma formatı [128].

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kan örnekleri

Çalışma toplam 160 kişi ile gerçekleştirilmiştir. Komplikasyonu bulunmayan hastalar grubu, mikrovasküler komplikasyonlu hastalar grubu, makrovasküler komplikasyonlu hastalar grubu ve hasta grupları ile uyumlu sağlıklı bireyler (kontrol) grubu olmak üzere 4 grup bulunmaktadır. Her grup 40 kişi olacak şekilde 120 hasta ve 40 sağlıklı birey ile çalışılmıştır. Çalışmadaki gönüllü hasta bireyler en az 10 yıllık tip 2 diyabet tanısı olan ve vücut kitle indeksleri (VKİ) 40'ın altında olan 18 ila 70 yaş arasındaki kişilerdir. Çalışmaya katılmadan önceki son 3 ay içerisinde COVID-19 tanısı koyulmuş gönüllü bireyler çalışmaya dâhil edilmemiştir. Çalışmaya dahil edilen bireylerin glukoz, total kolesterol, HDL, LDL, trigliserid, kreatinin ve HbA1c değerlerinin ölçümleri de yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan kan örnekleri Gazi Hastanesi'nde gönüllü hasta ve gönüllü sağlıklı bireylerden toplanmıştır. Mor kapaklı EDTA'lı biyokimyasal analiz tüpüne alınıp etiketlenen kan örnekleri DNA izolasyonu için kullanılmak üzere -80°C dondurucu dolapta saklanmıştır.

##### 3.1.2. Kimyasal malzemeler

DNA izolasyon kiti (Omega EZNA® Tissue DNA Kit), izopropil alkol (Merck), etil alkol (Merck), PBS tablet (Fosfat tamponlu salin) (Amresco), RNase (AppliChem), distile su, Taq Buffer (Thermo), MgCl<sub>2</sub> (Thermo), dNTP seti (Ampliqon) , primerler (Sentebiolab), Taq enzimi (Thermo), restriksiyon enzimleri ve bufferları (Thermo), Tris (Merck), asetik asit (Merck), EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) (Merck), TAE Buffer (Tris-Asetat-EDTA), TE Buffer (Tris-EDTA), DNA Ladder (100 bp ve 50 bp) (Thermo), agaroz (Applchem), 6X jel yükleme boyası, etidyum bromür (Sigma), LightSNiP Assay (TIB MOLBIOL), LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics).



### 3.1.3. Sarf malzeme ve cihazlar

Nitril eldiven, steril kabin (Holten), mikropipet ve mikropipet uçları (Gilson), mikrosantrifüj tüpleri (Thermo), beher, santrifüj (Hettich), sıcak su banyosu (Falc), ısıtma tablası (Stuart), vorteks (Daigger), +4°C soğutucu dolap (SANYO), -30°C ve -80°C dondurucu dolaplar (SANYO), NanoDrop 1000 Spektrofotometre, spin cihazı (Cleaver Scientific), PCR cihazları (Biometra ve Eppendorf), tüp rakları, soğutucu rak, hassas terazi (Scaltec), erlenmayer, mikrodalga (Samsung), agaroz jel tabağı ve tarağı, jel elektroforez cihazı (SCIE-PLAS), güç kaynağı (Wealtec), jel görüntüleme sistemi (Biometra), 37°C etüv (Memmert), otoklav (Tomy), distile su cihazı, Geneious Prime 2019.2 Software, Benchling R&D Cloud Software, 96 kuyulu plakalar ve sealing film (Roche Diagnostics), LightCycler® 480 Basic Software 1.5.1 (Roche Diagnostics), LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics), SPSS Statistics 18.0.

### 3.1.4. Çözeltilerin hazırlanışı

PBS Buffer (Fosfat tamponlu salin) (1X): 1 adet PBS tableti 100 ml distile suda çözülmüştür (pH 7,4) ve +4°C soğutucu dolapta saklanmıştır.

TAE Buffer (Tris-Asetat-EDTA) (50X): 242 g Tris base bir miktar distile suyun içinde çözülmüştür. Ardından 57,1 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml 500 mM EDTA (pH 8,0) eklenip, distile suyla son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır ve +4°C soğutucu dolapta saklanmıştır.

TAE Buffer (Tris-Asetat-EDTA) (1X): 20 ml 50X TAE buffer üzerine 980 ml distile su eklenmiştir.

TE Buffer: 10mM Tris çözeltisinden 10 ml ile 1mM EDTA çözeltisinden 1 ml karıştırılmıştır, son hacim ise distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

Agaroz jel (%2'lik): 1,2 g agaroz ile 60ml 1X TAE bir erlenmayer içine eklendikten sonra mikrodalga içerisinde aralıklarla karıştırılarak tamamen çözünene kadar 2-3 dakika boyunca ısıtılmıştır. Bir süre soğutulan jel, üzerinde jel tarağı bulunan jel tabağına dökülmüştür.

Jel yükleme boyası (6X): 4 g süktroz ve 0,25 g bromfenol mavisi bir miktar distile su içerisinde çözüldükten sonra son hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır.

Etidyum Bromürlü boya çözeltilisi: Geniş bir kabın içerisinde 500 ml TAE döküldükten sonra üzerine 80 µl Etidyum Bromür eklenerek hazırlanmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Kandan DNA izolasyonu**

1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmış olan 200µL'lik kan örneklerinin üzerine 50 µl PBS eklenmiştir. 25 µl Proteinaz K eklendikten sonra tüplere 250 µl BL Buffer ilave edilmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra 4 µl RNase A eklenmiş ve örnekler oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiştir. 10 dakika boyunca 70°C'de inkübe edilen örnekler inkübasyon sırasında bir kez vortekslenmiştir. Tüplere 250 µl %100'lük etanol eklendikten sonra tekrar vortekslenmiştir. Ardından tüpün içindeki örnekler filtreli koleksiyon tüplerine aktarılmıştır. 1 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edildikten sonra koleksiyon tüpündeki sıvı boşaltılmıştır. Filtrenin üzerine 500 µl HBC Buffer'ı eklenmiştir ve maksimum hızda 30 saniye boyunca santrifüj edilmiştir. Filtre kısmı yeni bir koleksiyon tüpüne geçirildikten sonra içerisinde 700 µl DNA Wash Buffer eklenmiştir. Maksimum hızda 30 saniye santrifüj edildikten sonra koleksiyon tüpündeki sıvı atılmıştır. 700 µl DNA Wash Buffer tekrar tüpe eklenmiş ve 30 saniye maksimum hızda santrifüj gerçekleştirilmiştir. Koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra boş filtre ve koleksiyon tüpü 2 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Daha sonra filtre kısmı yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Filtrenin üzerine daha önceden 70°C'de ısıtılmış olan Elution Buffer'dan 75 µl eklenmiş ve 2 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 1 dakika maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Bu adım bir kez daha tekrar edilmiştir ve elde edilen DNA örnekleri etiketlenmiştir. Daha sonra Polimeraz Zincir Reaksiyonu – Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) ve Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR (qPCR)) gerçekleştirilmek üzere -30°C dondurucu dolapta saklanmıştır.

### 3.2.2. DNA konsantrasyonlarının ölçümü

İzolasyondan elde edilmiş olan DNA örneklerinin konsantrasyonları NanoDrop 1000 Spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. Ölçülen değerler ve grafikleri bilgisayara kaydedilmiştir.

### 3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmek üzere öncelikle her gen bölgesi üzerinde çalışılmak üzere belirlenmiş olan SNP'lere uygun forward ve reverse primerler Geneious Prime 2019.2 programı ile tasarlanmıştır (Çizelge 3.1)

Çizelge 3.1. SNP'ler için kullanılan primerler ve PCR ürünlerinin boyutları.

| Gen    | SNP        | Primerler                                       | PCR Ürün Boyutu |
|--------|------------|-------------------------------------------------|-----------------|
| NAMPT  | rs61330082 | Forward Primer:<br>5' GCAGTTCTCATGCGTGGTTG'3    | 673 bp          |
|        |            | Reverse Primer:<br>5' GAGACTGAGGCAGGAGGATG'3    |                 |
|        | rs2058539  | Forward Primer:<br>5' CAGGAAGGATCTCTGGAGC'3     | 442 bp          |
|        |            | Reverse Primer:<br>5' AACTACCTGTGTCTCTGGAC'3    |                 |
| IL-6   | rs2069860  | Forward Primer:<br>5' CCTCCACTGCAAAGGATTTATT'3  | 537 bp          |
|        |            | Reverse Primer:<br>5' CTTTCCAAGAAATGATCTGGCTC'3 |                 |
|        | rs1554606  | Forward Primer:<br>5' ACCAACTTGTGCGCACTCACT'3   | 941 bp          |
|        |            | Reverse Primer:<br>5' AAGTGGCATTGCATCCCTGA'3    |                 |
| Vaspin | rs77060950 | Forward Primer:<br>5' TCTGATGGGAACACAGAACAC'3   | 506 bp          |
|        |            | Reverse Primer:<br>5' TTTGGAGTGGGATTCTCAACC'3   |                 |
|        | rs2236242  | Forward Primer:<br>5' GAAGGTGGACAATACCCTGTC'3   | 818 bp          |
|        |            | Reverse Primer:<br>5' CAGAAGTCTGGCTTTGTGAGA'3   |                 |

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere dNTP Mix'i hazırlanmıştır. Steril bir mikrosantrifüj tüpüne 25 µl dATP (100 mM), 25 µl dCTP (100 mM), 25 µl dGTP (100 mM) ve 25 µl dTTP (100 mM) eklenerek 100 µl dNTP Mix (25 mM) elde edilmiştir. Bütün SNP'ler için ayrı ayrı Master Mix'ler hazırlanmıştır. Master Mix hazırlanırken her bir DNA örneği için; 5 µl Taq Buffer + KCl (10X), 4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl dNTP (25 mM), 0,1 µl

Forward Primer, 0,1 µl Reverse Primer, 35,65 µl steril distile su, 0,15 µl Taq DNA Polimeraz (10 U/µl) steril bir mikrosantrifüj tüpüne ilave edilmiş ve spin cihazı ile karıştırılmıştır (Çizelge 3.2). Ardından, önceden etiketlenmiş olan 0,5 ml ve 0,2 ml'lik PCR tüplerine 46 µl Master Mix dağıtılmıştır. Son olarak PCR tüplerinin içerisine 4 µl DNA örneklerinden ilave edilmiş ve spin cihazı ile karıştırılmıştır. PCR tüpleri Biometra ve Eppendorf PCR cihazlarına yerleştirilmiştir. Primerlere uygun PCR programları ayarlandıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu başlatılmıştır. PCR programı sonlandığında elde edilen PCR örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -30°C dondurucu dolapta saklanmıştır.

Çizelge 3.2. PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları

| PCR Bileşeni                           | 1X Örnek için Miktarları (µl) |
|----------------------------------------|-------------------------------|
| 10X Taq Buffer + KCl                   | 5                             |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>                | 4                             |
| 25 mM dNTP                             | 1                             |
| Forward Primer                         | 0,1                           |
| Reverse Primer                         | 0,1                           |
| Steril distile su (ddH <sub>2</sub> O) | 35,65                         |
| Taq DNA Polimeraz (10 U/µL)            | 0,15                          |
| DNA                                    | 4                             |
| Total                                  | 50                            |

#### Polimeraz zincir reaksiyonu programları

NAMPT, IL-6 ve Vaspın genlerinin rs61330082, rs2058539, rs2069860, rs1554606, rs77060950 ve rs2236242 SNP'leri için kullanılmış olan PCR programları Çizelge 3.3, Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. rs61330082 ve rs2058539 SNP'leri için kullanılan PCR programları.

| NAMPT           |               |            |              |               |            |              |
|-----------------|---------------|------------|--------------|---------------|------------|--------------|
| PCR Basamakları | Sıcaklık (°C) | rs61330082 |              | Sıcaklık (°C) | rs2058539  |              |
|                 |               | Zaman (sn) | Döngü Sayısı |               | Zaman (sn) | Döngü Sayısı |
| Ön Denatürasyon | 95            | 300        | 1            | 95            | 300        | 1            |
| Denatürasyon    | 94            | 30         |              | 94            | 30         |              |
| Bağlanma        | 58            | 30         | 35           | 55            | 30         | 35           |
| Uzama           | 72            | 60         |              | 72            | 60         |              |
| Son Uzama       | 72            | 300        | 1            | 72            | 300        | 1            |

Çizelge 3.4. rs2069860 ve rs1554606 SNP'leri için kullanılan PCR programları.

| IL-6            |               |            |              |               |            |              |
|-----------------|---------------|------------|--------------|---------------|------------|--------------|
| PCR Basamakları | Sıcaklık (°C) | rs2069860  |              | Sıcaklık (°C) | rs1554606  |              |
|                 |               | Zaman (sn) | Döngü Sayısı |               | Zaman (sn) | Döngü Sayısı |
| Ön Denatürasyon | 95            | 300        | 1            | 95            | 300        | 1            |
| Denatürasyon    | 94            | 30         |              | 94            | 30         |              |
| Bağlanma        | 50            | 30         | 35           | 58            | 30         | 35           |
| Uzama           | 72            | 60         |              | 72            | 60         |              |
| Son Uzama       | 72            | 300        | 1            | 72            | 300        | 1            |

Çizelge 3.5. rs77060950 ve rs2236242 SNP'leri için kullanılan PCR programları.

| Vaspin          |               |            |              |               |            |              |
|-----------------|---------------|------------|--------------|---------------|------------|--------------|
| PCR Basamakları | Sıcaklık (°C) | rs77060950 |              | Sıcaklık (°C) | rs2236242  |              |
|                 |               | Zaman (sn) | Döngü Sayısı |               | Zaman (sn) | Döngü Sayısı |
| Ön Denatürasyon | 95            | 300        | 1            | 95            | 300        | 1            |
| Denatürasyon    | 94            | 30         |              | 94            | 30         |              |
| Bağlanma        | 59            | 30         | 35           | 59            | 30         | 35           |
| Uzama           | 72            | 60         |              | 72            | 60         |              |
| Son Uzama       | 72            | 300        | 1            | 72            | 300        | 1            |

#### Polimeraz zincir reaksiyonu örneklerinin jel elektroforezi

Jel elektroforez cihazı içine yerleştirilmiş olan %2'lik agaroz jelin kuyularına 4 µl 100 bp DNA Ladder ve yaklaşık 1 µl 6X jel yükleme boyası ile karıştırılmış 8 µl PCR örneklerinden yüklenmiştir. Jel elektroforez cihazı güç kaynağı bağlandıktan sonra, jel 30 dakika boyunca 110 Volt'ta yürütülmüştür.

#### Polimeraz zincir reaksiyonu örneklerinin jel görüntülemesi

Jel elektroforez cihazı güç kaynağından çekildikten sonra jel, tabağı ile birlikte cihazdan çıkarılmıştır. Etidyum Bromürlü boya çözeltisinin bulunduğu kabın içerisine aktarılan jel, boyanması için 5 dakika boyunca çözelti içinde bekletilmiştir. Sonrasında jel görüntüleme cihazına yerleştirilen jelin görüntüsü alınmış ve bilgisayara kaydedilmiştir.

### 3.2.4. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP)

Amplifikasyonun düzgün bir şekilde gerçekleştiği belirlenen PCR ürünleri uygun restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiştir. Her SNP için kullanılan restriksiyon enzim kesimi Çizelge 3.6’da belirtilmiştir.

Çizelge 3.6. Her SNP için kullanılan restriksiyon enzimleri ve kesim bölgeleri.

| RFLP Enzimleri |            |                 |                                                                      |
|----------------|------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------|
| Gen            | SNP        | Enzim (10 U/μl) | Kesim Bölgesi                                                        |
| NAMPT          | rs61330082 | MvaI (BstNI)    | 5'...CC/WGG...3<br>3'...GGW/CC...5                                   |
|                | rs2058539  | HphI            | 5'...GGTGA(N) <sub>8</sub> /...3<br>3'...CCACT(N) <sub>7</sub> /...5 |
| IL-6           | rs2069860  | XbaI            | 5'...T/CTAGA...3<br>3'...AGATC/T...5                                 |
|                | rs1554606  | DdeI (HpyF3I)   | 5'...C/TNAG...3<br>3'...GANT/C...5                                   |
| Vaspin         | rs77060950 | Mbol            | 5'.../GATC...3<br>3'...CTAG/...5                                     |
|                | rs2236242  | FspI (NsbI)*    | 5'...TGC/GCA...3<br>3'...ACG/CGT...5                                 |

\*: FspI enzimi mutasyon olduğunda kesimi gerçekleştirir.

N = A, C, G, T'den herhangi biri, W = A veya T (zayıf)

Restriksiyon enzim kesimi için öncelikle mix hazırlanmıştır. Her restriksiyon enzimi için farklı bir mix hazırlanmıştır. Enzim kesiminde kullanılmak üzere mix hazırlanırken her PCR ürünü için; steril bir mikrosantrifüj tüpünün içerisine 1 μl 10X Buffer, 0,1 μl restriksiyon enzimi, 3,9 μl steril distile su eklenmiştir ve birkaç saniyeliğine spin verilmiştir. Etiketlenmiş olan 0,5 ml PCR tüpleri içerisine 5 μl mix dağıtılmıştır (Çizelge 3.7). Son olarak PCR tüplerine 5 μl PCR ürünü eklenmiştir ve tekrar spin verilmiştir. Gece boyu inkübasyona bırakılacak tüplerin kapakları parafilm ile kapatılmıştır. Bütün tüpler inkübasyon için her enzime uygun süreler boyunca 37°C etüvde bırakılmıştır (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.7. Restriksiyon enzim kesimi bileşenleri ve miktarları.

| Restriksiyon Enzim Kesimi Bileşenleri  | 1X Örnek için Miktarlar (μl) |
|----------------------------------------|------------------------------|
| 10X Buffer                             | 1                            |
| Restriksiyon Enzimi (10 U/μl)          | 0,1                          |
| Steril distile su (ddH <sub>2</sub> O) | 3,9                          |
| DNA                                    | 5                            |
| Total                                  | 10                           |

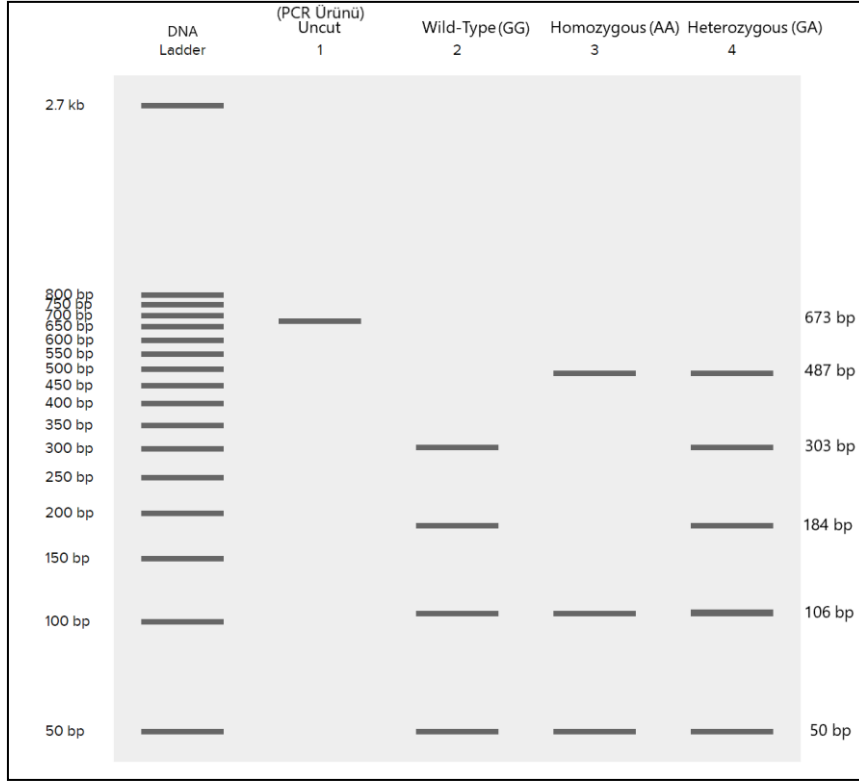
Çizelge 3.8. Kullanılan restriksiyon enzimlerinin Bufferları ve inkübasyon süreleri.

| Restriksiyon Enzimleri | Bufferlar    | İnkübasyon Süreleri (Saat) |
|------------------------|--------------|----------------------------|
| MvaI (BstNI)           | Buffer R     | 2                          |
| HphI                   | Buffer B     | 16                         |
| XbaI                   | Tango Buffer | 3                          |
| DdeI (HpyF3I)          | Tango Buffer | 2                          |
| Mbol                   | Buffer R     | 2                          |
| FspI (NsbI)            | Tango Buffer | 2                          |

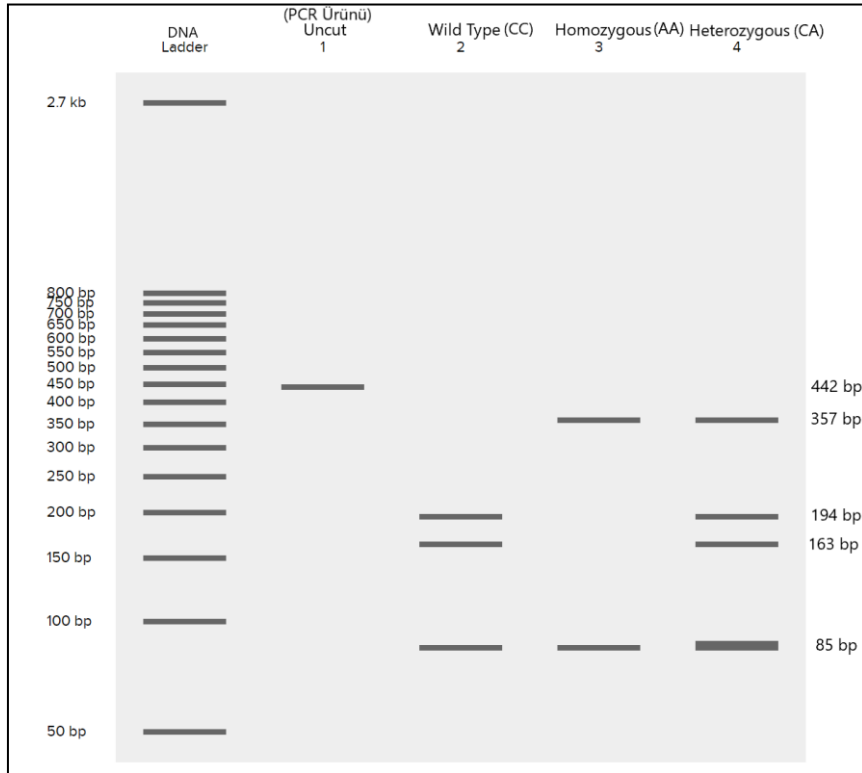
#### Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi örneklerinin jel elektroforezi

İnkübasyon bittikten sonra etüvden alınan örnekler, önceden hazırlanmış ve jel elektroforez cihazı içine yerleştirilmiş olan %2'lik agaroz jelin kuyularına yüklenmiştir. Sırasıyla; 4 µl 50 bp DNA Ladder, yaklaşık 1 µl 6X jel yükleme boyası ile karıştırılmış 5 µl PCR ürünü (enzim kesimine maruz bırakılmamış ürün, uncut), yaklaşık 1 µl 6X jel yükleme boyası ile karıştırılmış 10 µl RFLP ürünü kuyuların içine bırakılmıştır. Jel elektroforez cihazı güç kaynağı bağlandıktan sonra, jel 30 dakika boyunca 100 Volt'ta yürütülmüştür.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi'nin sonucunda, rs61330082, rs2058539, rs2069860, rs1554606, rs77060950 ve rs2236242 SNP'leri için görüntülenecek bant büyüklükleri Benchling R&D Cloud Software sanal jel simülatörü ile belirlenmiştir (Şekil 3.1-3.6).

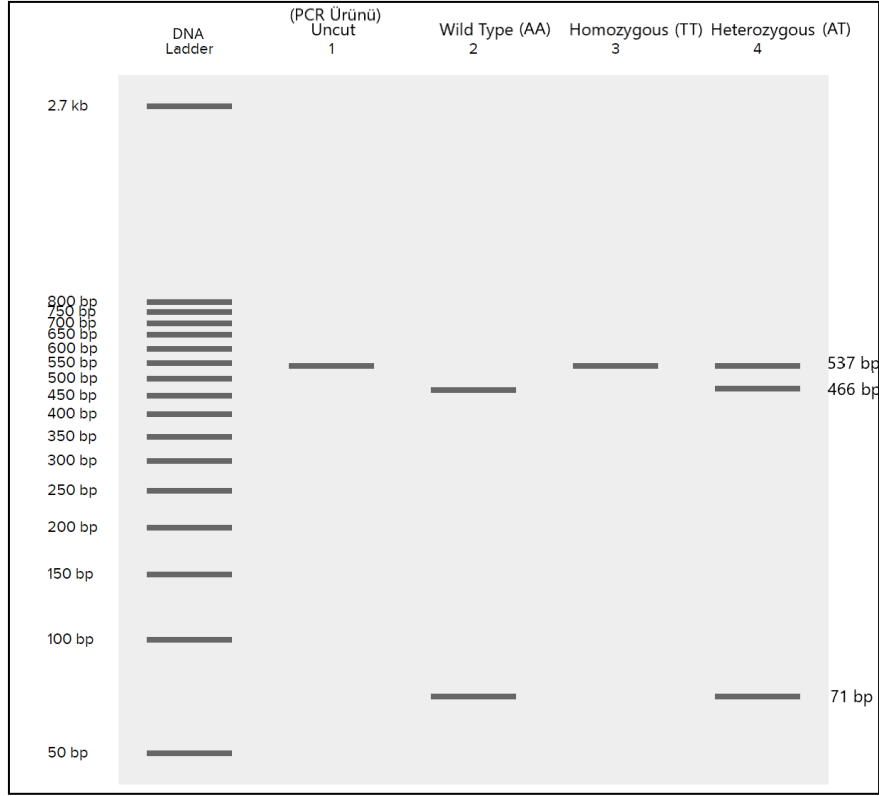


Şekil 3.1. *NAMPT* geni rs61330082 SNP'inin beklenen restriksiyon enzim kesimi jel görüntüsü.

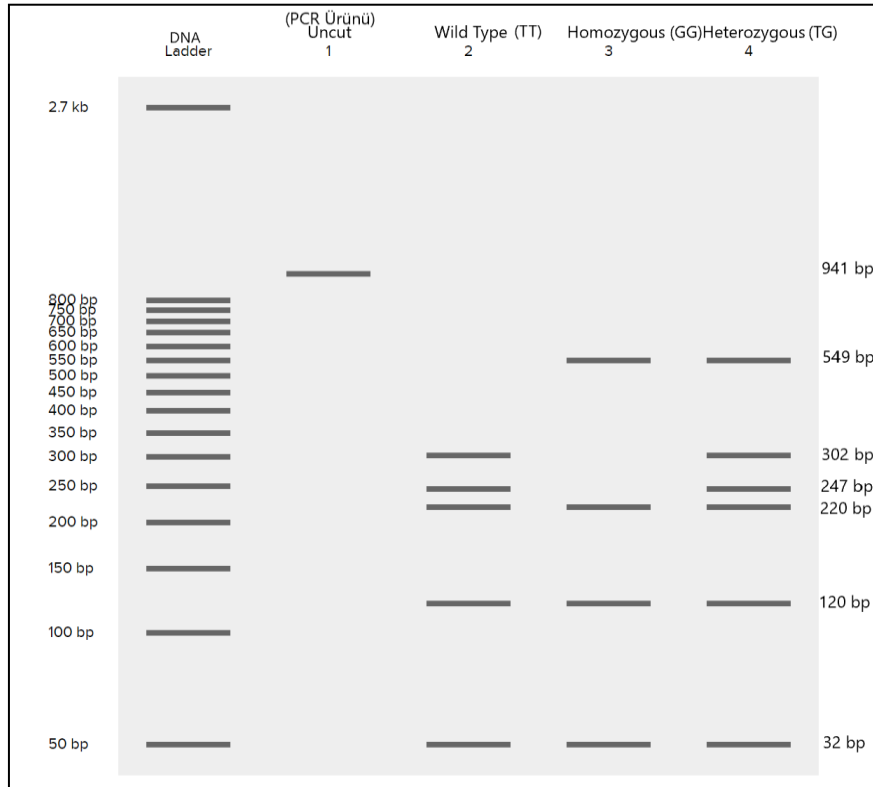


Şekil 3.2. *NAMPT* geni rs2058539 SNP'inin beklenen restriksiyon enzim kesimi jel görüntüsü.

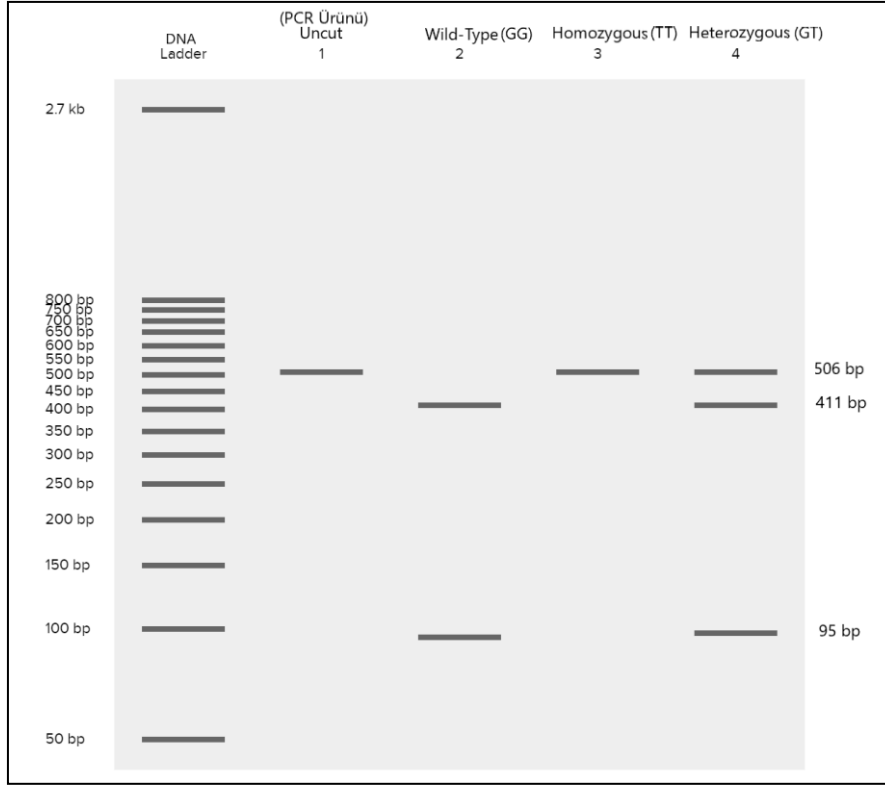




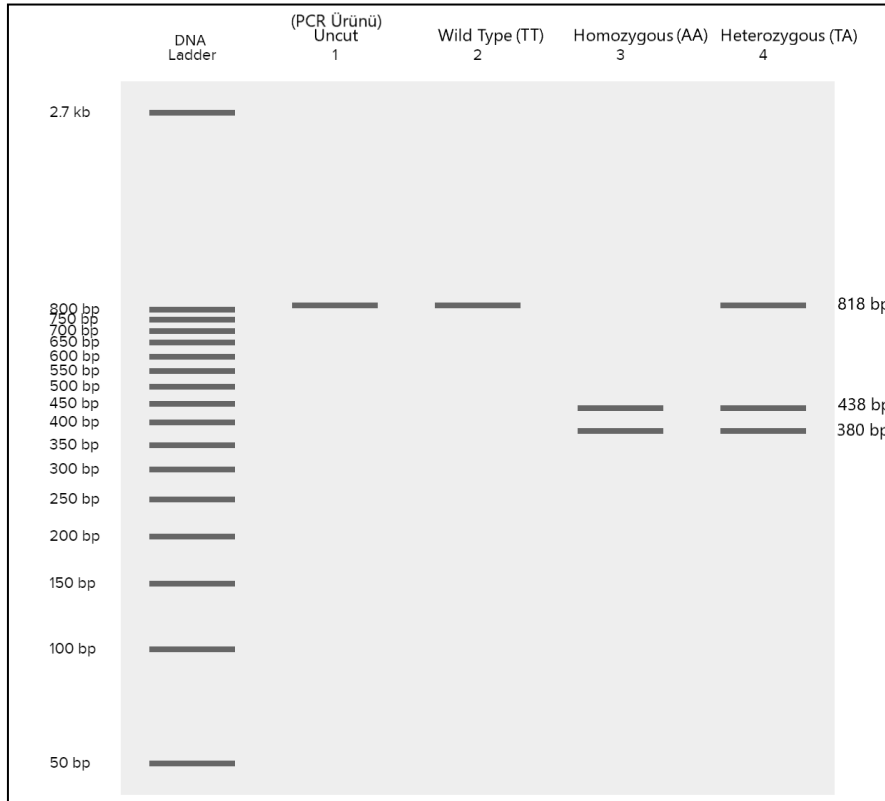
Şekil 3.3. *IL-6* geni rs2069860 SNP'inin beklenen restriksiyon enzim kesimi jel görüntüsü.



Şekil 3.4. *IL-6* geni rs1554606 SNP'inin beklenen restriksiyon enzim kesimi jel görüntüsü.



Şekil 3.5. *Vaspin* geni rs77060950 SNP'inin beklenen restriksiyon enzim kesimi jel görüntüsü.



Şekil 3.6. *Vaspin* geni rs2236242 SNP'inin beklenen restriksiyon enzim kesimi jel görüntüsü.

### Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi örneklerinin jel görüntülemesi

Jel elektroforez cihazı güç kaynağından çekildikten sonra jel, tabağı ile birlikte cihazdan çıkarılmıştır. Etidyum Bromürlü boya çözeltisinin bulunduğu kabın içerisine aktarılan jel, boyanması için 5 dakika boyunca çözelti içinde bekletilmiştir. Sonrasında jel görüntüleme cihazına yerleştirilen jelin görüntüsü alınmış ve bilgisayara kaydedilmiştir.

### **3.2.5. LightSNiP Assay ile kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR (qPCR))**

6 SNP (rs61330082, rs2058539, rs2069860, rs1554606, rs77060950 ve rs2236242) için özel tasarlanmış olan LightSNiP Assay Reagent Mix'leri açılmadan önce içerisindeki sarı çökelti tamamıyla tüpün dibine çökene kadar tüplere spin verilmiştir. Daha sonrasında Reagent Mix tüplerinin içerisine 100 µl PCR-sınıfı su (H<sub>2</sub>O) ilave edilmiştir. Reagent Mix tüpleri iyice vortlenmiş ve spin verilerek karıştırılmıştır. Reagent Mix hazırlandıktan sonra her SNP için ayrı bir Reaksiyon Mix'i hazırlanmıştır. Reaksiyon Mix'i steril bir 0,2 ml PCR tüpü içerisine; 2,7 - 6,7 µl PCR-sınıfı su (H<sub>2</sub>O), 1 µl LC FastStart DNA Master HybProbe, 0,8 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM) ve 0,5 µl Reagent Mix eklenerek hazırlanmıştır (Çizelge 3.9). Reaksiyon Mix'i tüpüne spin verilmiştir ardından 96 kuyulu plaka içerisine, her kuyuya eşit miktarda (5-9 µl) dağıtılmıştır. Ardından -30°C dondurucu dolaptan çıkarılıp çözölmüş olan DNA örneklerine spin verilmiştir. DNA örneklerinin NanoDrop'ta ölçölmüş konsantrasyonlarına göre, bütün örnekler ~50 ng olacak şekilde hesaplanarak 1-5 µl DNA kuyuların içerisine dağıtılmıştır.

Çizelge 3.9. LightSNiP Assay Kantitatif PCR (qPCR) Reaksiyon Mix bileşenleri ve miktarları.

| Reaksiyon Bileşenleri            | 1X Örnek için Miktarları (µl) |
|----------------------------------|-------------------------------|
| PCR-Sınıfı Su (H <sub>2</sub> O) | 2,7 - 6,7                     |
| Reagent Mix                      | 0,5                           |
| LC FastStart DNA Master HybProbe | 1                             |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)        | 0,8                           |
| DNA (~50 ng)                     | 1 - 5                         |
| Total                            | 10                            |

Bütün örnekler dağıtıldıktan sonra 96 kuyulu plakanın üzeri sealing film ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılmıştır. LightCycler® 480 Basic Software 1.5.1 programında algılama formatı olarak Simple Probe seçildikten sonra LightSNiP Assay için kullanılan

program değerleri girilmiştir (Çizelge 3.10). Ardından 96 kuyulu plaka LightCycler® 480 II cihazı içerisine yerleştirilmiştir ve program başlatılmıştır.

LightSNiP Assay kantitatif qPCR’ın LightCycler® 480 II cihaz programı

Çizelge 3.10. LightSNiP Assay için kullanılan LightCycler® 480 II Cihaz Programı

|                  | Denaturation | Cycling        |        |       |       | Melting        |          | Cooling |
|------------------|--------------|----------------|--------|-------|-------|----------------|----------|---------|
| Analysis Mode    | None         | Quantification |        |       |       | Melting Curves |          | None    |
| Cycles           | 1            | 45             |        |       |       | 1              |          | 1       |
| Segment          | 1            | 1              | 2      | 3     | 1     | 2              | 3        | 1       |
| Target (°C)      | 95           | 95             | 60     | 72    | 95    | 40             | 75       | 40      |
| Hold (mm:ss)     | 10:00        | 00:10          | 00:10  | 00:15 | 00:30 | 02:00          | 00:00    | 00:30   |
| Ramp Rate (°C/s) | 4.4          | 4.4            | 2.2    | 4.4   | 4.4   | 1.5            | -        | 1.5     |
| Acquis. Mode     | None         | None           | Single | None  | None  | None           | Continu. | None    |
| Acquis. (per °C) |              |                |        |       |       |                | 3        |         |

### 3.2.6. İstatistiksel analizleri

Çalışmadaki verilerin analizleri için SPSS Statistics 18.0 programı ile gerçekleştirildi. Çalışma gruplarındaki genomik dağılım ve allel sıklığı Hardy-Weinberg denkliği ile  $\chi^2$  testiyle analiz edilmiştir ve olasılık oranları (OR) hesaplanmıştır.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışma Gruplarının Verileri

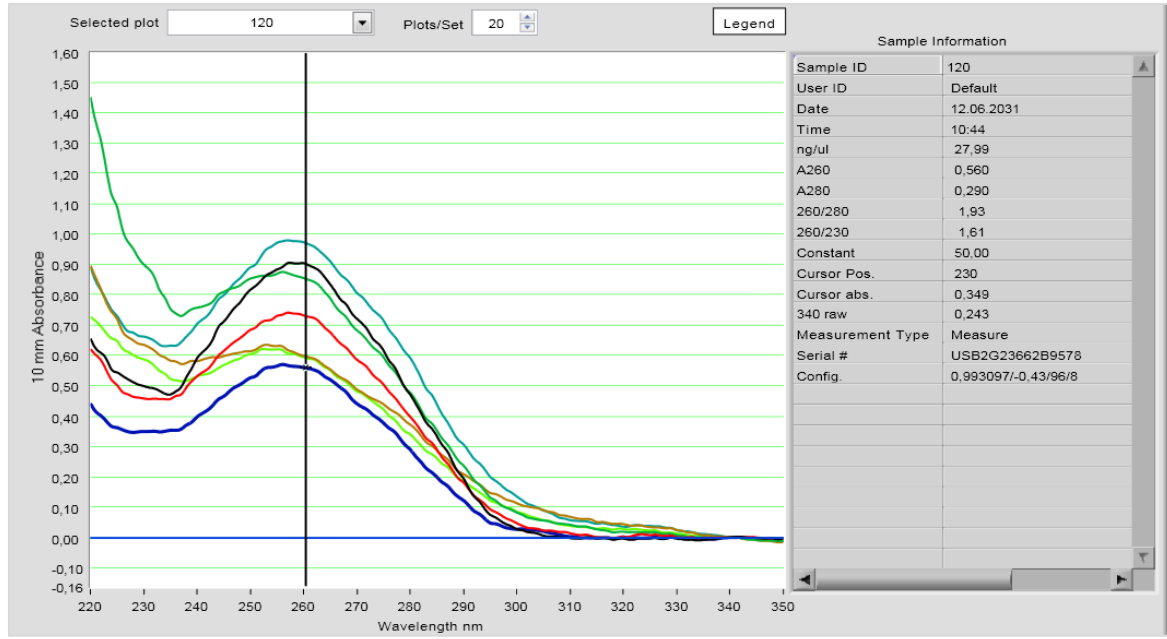
Çalışmaya katılan gönüllü bireylerin yaş, cinsiyet vücut kitle indeksleri, kaç yıldır T2DM tanısına sahip oldukları, glukoz, Hb1Ac, HDL, LDL, total kolesterol, trigliserid ve kreatinin değerleri gibi bilgilerinin çalışma gruplarına göre dağılımı Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışma gruplarının yaş, cinsiyet, VKİ, T2DM süreleri ve kan değerleri.

|                     | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Kontrol (Sağlıklı) Grubu |
|---------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------|
| Kişi Sayısı (N)     | 40                                | 40                                       | 40                                       | 40                       |
| Cinsiyet            | Kadın                             | 27                                       | 20                                       | 26                       |
|                     | Erkek                             | 13                                       | 20                                       | 14                       |
| Yaş (Ortalama)      | 58.65 ± 6.91                      | 59.05 ± 6.83                             | 62.30 ± 6.23                             | 48.48 ± 7.93             |
| VKİ                 | 28.95 ± 4.33                      | 29.16 ± 5.74                             | 29.84 ± 4.65                             | 26.59 ± 3.62             |
| T2DM süreleri (Yıl) | 15 ± 5.11                         | 16.05 ± 5.11                             | 15.28 ± 5.69                             | -                        |
| Glukoz              | 157.4 ± 53.24                     | 160.50 ± 63.33                           | 176.58 ± 70.43                           | 89.58 ± 8.14             |
| HbA1c               | 7.84 ± 1.90                       | 8.20 ± 1.77                              | 8.82 ± 1.81                              | 5.75 ± 0.29              |
| HDL                 | 52.75 ± 13.83                     | 51.68 ± 12.44                            | 43.05 ± 8.27                             | 54.60 ± 12.95            |
| LDL                 | 123.13 ± 79.26                    | 122.38 ± 37.47                           | 96.90 ± 34.81                            | 145.85 ± 36.33           |
| Total Kolesterol    | 205.28 ± 44.67                    | 205.43 ± 48.56                           | 173.53 ± 43.55                           | 225.85 ± 43.95           |
| Trigliserid         | 159.00 ± 79.26                    | 160.23 ± 86.28                           | 167.23 ± 84.36                           | 127.13 ± 61.86           |
| Kreatinin           | 0.71 ± 0.17                       | 0.80 ± 0.32                              | 0.89 ± 0.42                              | 0.69 ± 0.17              |

### 4.2. NanoDrop ile DNA Konsantrasyon Ölçümü

İzolasyon sonucu elde edilen DNA’ların konsantrasyonları NanoDrop cihazıyla belirlenmiştir (Şekil 4.1). Komplikasyonu olmayan hasta grubu, mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubu, makrovasküler komplikasyonlu hasta grubu ve kontrol (sağlıklı) grubuna ait 40 örnek için belirlenen değerler Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5’te verilmiştir.



Şekil 4.1. DNA örneklerinin NanoDrop ölçüm grafiği.

Çizelge 4.2. Komplikasyonu olmayan hasta grubu NanoDrop ölçümleri.

| Örnek No. | DNA Kons. (ng/µl) | Örnek No. | DNA Kons. (ng/µl) |
|-----------|-------------------|-----------|-------------------|
| Ko-1      | 69,4              | Ko-21     | 21,0              |
| Ko-2      | 60,8              | Ko-22     | 19,5              |
| Ko-3      | 24,4              | Ko-23     | 29,5              |
| Ko-4      | 33,6              | Ko-24     | 31,2              |
| Ko-5      | 43,6              | Ko-25     | 44,8              |
| Ko-6      | 31,8              | Ko-26     | 46,3              |
| Ko-7      | 15,4              | Ko-27     | 42,8              |
| Ko-8      | 39,9              | Ko-28     | 40,5              |
| Ko-9      | 16,4              | Ko-29     | 50,7              |
| Ko-10     | 31,7              | Ko-30     | 21,1              |
| Ko-11     | 24,6              | Ko-31     | 26,8              |
| Ko-12     | 25,8              | Ko-32     | 35,5              |
| Ko-13     | 70,6              | Ko-33     | 25,9              |
| Ko-14     | 23,0              | Ko-34     | 43,9              |
| Ko-15     | 32,9              | Ko-35     | 36,6              |
| Ko-16     | 23,7              | Ko-36     | 42,8              |
| Ko-17     | 21,6              | Ko-37     | 30,0              |
| Ko-18     | 18,7              | Ko-38     | 29,7              |
| Ko-19     | 71,0              | Ko-39     | 48,6              |
| Ko-20     | 20,0              | Ko-40     | 28,0              |

Çizelge 4.3. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubu NanoDrop ölçümleri.

| Örnek No. | DNA Kons. (ng/μl) | Örnek No. | DNA Kons. (ng/μl) |
|-----------|-------------------|-----------|-------------------|
| Mi-1      | 14,1              | Mi-21     | 23,6              |
| Mi-2      | 73,9              | Mi-22     | 30,3              |
| Mi-3      | 55,8              | Mi-23     | 24,1              |
| Mi-4      | 51,4              | Mi-24     | 43,2              |
| Mi-5      | 75,8              | Mi-25     | 72,5              |
| Mi-6      | 42,2              | Mi-26     | 31,3              |
| Mi-7      | 48,0              | Mi-27     | 29,9              |
| Mi-8      | 82,7              | Mi-28     | 30,3              |
| Mi-9      | 15,1              | Mi-29     | 28,6              |
| Mi-10     | 42,8              | Mi-30     | 38,3              |
| Mi-11     | 36,5              | Mi-31     | 75,5              |
| Mi-12     | 81,6              | Mi-32     | 39,9              |
| Mi-13     | 62,0              | Mi-33     | 191,6             |
| Mi-14     | 61,6              | Mi-34     | 45,8              |
| Mi-15     | 110,2             | Mi-35     | 20,7              |
| Mi-16     | 52,6              | Mi-36     | 28,2              |
| Mi-17     | 32,7              | Mi-37     | 60,3              |
| Mi-18     | 43,6              | Mi-38     | 24,7              |
| Mi-19     | 37,1              | Mi-39     | 68,8              |
| Mi-20     | 31,6              | Mi-40     | 25,4              |

Çizelge 4.4. Makrovasküler komplikasyonlu hasta grubu NanoDrop ölçümleri.

| Örnek No. | DNA Kons. (ng/μl) | Örnek No. | DNA Kons. (ng/μl) |
|-----------|-------------------|-----------|-------------------|
| Ma-1      | 48,0              | Ma-21     | 29,5              |
| Ma-2      | 35,3              | Ma-22     | 46,0              |
| Ma-3      | 30,9              | Ma-23     | 31,4              |
| Ma-4      | 45,9              | Ma-24     | 30,3              |
| Ma-5      | 45,4              | Ma-25     | 40,2              |
| Ma-6      | 62,5              | Ma-26     | 12,8              |
| Ma-7      | 61,4              | Ma-27     | 23,4              |
| Ma-8      | 46,2              | Ma-28     | 22,1              |
| Ma-9      | 72,7              | Ma-29     | 27,8              |
| Ma-10     | 63,9              | Ma-30     | 39,9              |
| Ma-11     | 41,1              | Ma-31     | 153,1             |
| Ma-12     | 27,2              | Ma-32     | 25,1              |
| Ma-13     | 44,5              | Ma-33     | 30,9              |
| Ma-14     | 44,5              | Ma-34     | 35,0              |
| Ma-15     | 32,1              | Ma-35     | 32,1              |
| Ma-16     | 51,5              | Ma-36     | 34,8              |
| Ma-17     | 33,9              | Ma-37     | 34,4              |
| Ma-18     | 37,3              | Ma-38     | 28,1              |
| Ma-19     | 174,6             | Ma-39     | 26,2              |
| Ma-20     | 48,5              | Ma-40     | 45,2              |



Çizelge 4.5. Kontrol (sağlıklı) grubu NanoDrop ölçümleri.

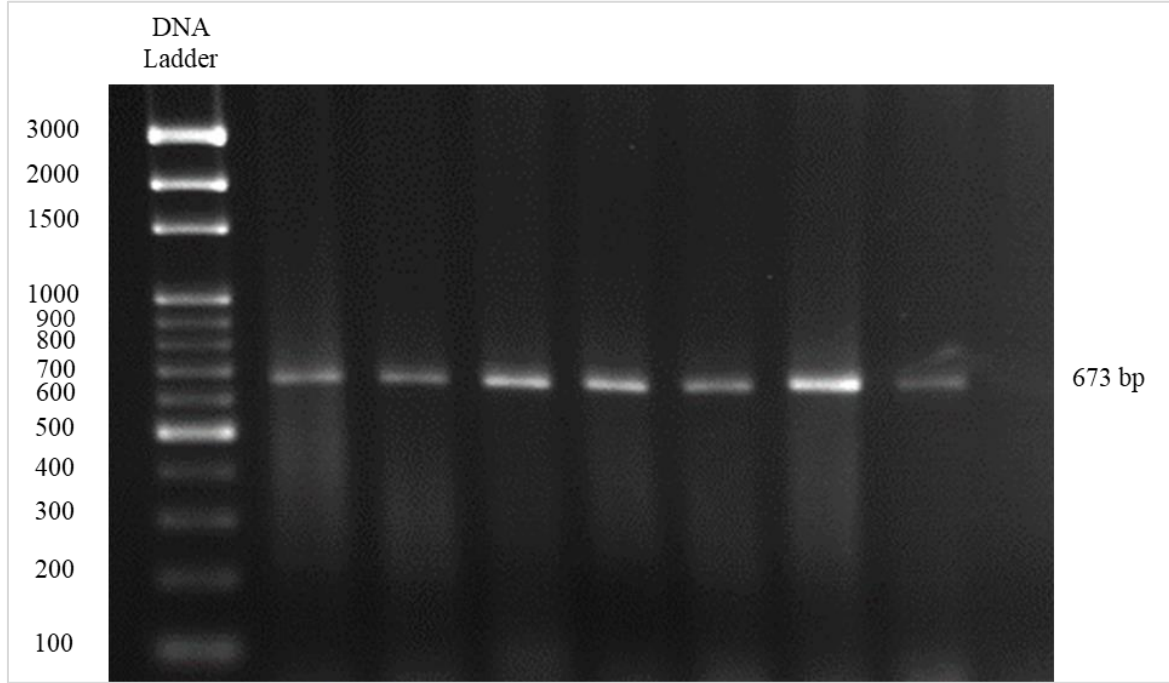
| Örnek No. | DNA Kons. (ng/μl) | Örnek No. | DNA Kons. (ng/μl) |
|-----------|-------------------|-----------|-------------------|
| S1        | 26,7              | S21       | 33,3              |
| S2        | 24,9              | S22       | 19,3              |
| S3        | 37,5              | S23       | 20,3              |
| S4        | 23,1              | S24       | 28,4              |
| S5        | 36,1              | S25       | 23,8              |
| S6        | 20,6              | S26       | 33,3              |
| S7        | 23,7              | S27       | 25,6              |
| S8        | 24,5              | S28       | 19,6              |
| S9        | 18,7              | S29       | 31,2              |
| S10       | 21,2              | S30       | 24,3              |
| S11       | 17,0              | S31       | 26,4              |
| S12       | 13,9              | S32       | 30,1              |
| S13       | 21,6              | S33       | 16,5              |
| S14       | 34,4              | S34       | 28,6              |
| S15       | 24,5              | S35       | 16,4              |
| S16       | 21,2              | S36       | 26,2              |
| S17       | 37,2              | S37       | 23,4              |
| S18       | 19,6              | S38       | 33,4              |
| S19       | 26,0              | S39       | 18,3              |
| S20       | 25,8              | S40       | 26,1              |

### 4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Toplamda 160 DNA örneği ile gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda PCR ürünleri elde edilmiştir. Jel elektroforezi sonucu rs61330082 için 673 bp (Şekil 4.2), rs2058539 için 442 bp (Şekil 4.3), rs2069860 için 537 bp (Şekil 4.4), rs1554606 için 941 bp (Şekil 4.5), rs77060950 için 506 bp (Şekil 4.6) ve rs2236242 818 bp (Şekil 4.7) boyutlarında PCR bantları görüntülenmiştir.

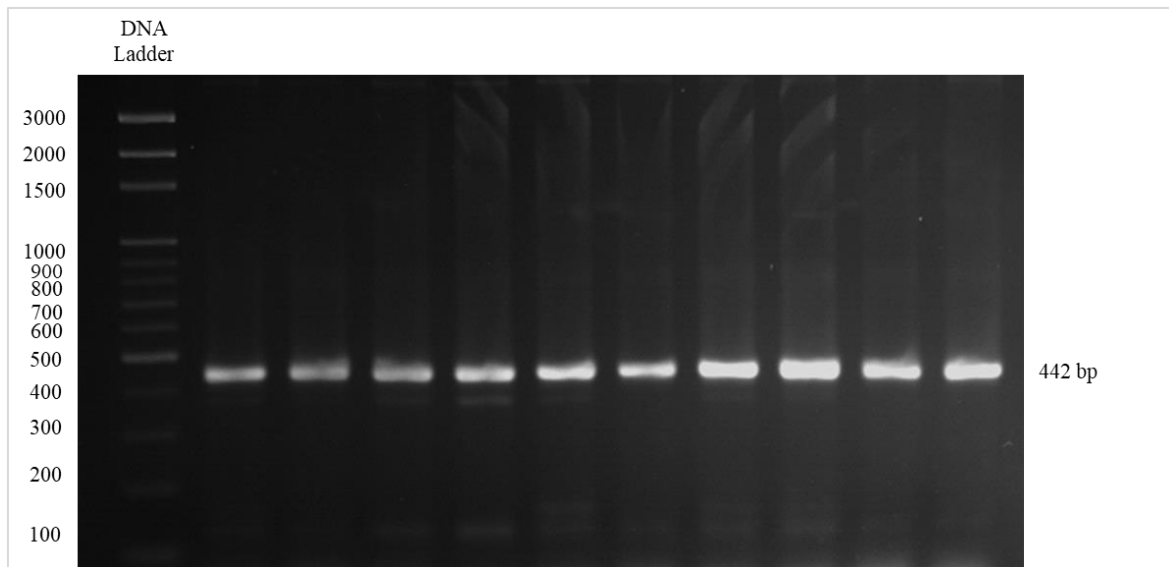
#### 4.3.1. *NAMPT* genine ait SNP'lerin PCR jel görüntüleri

rs61330082



Şekil 4.2. rs61330082 SNP'ine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü.

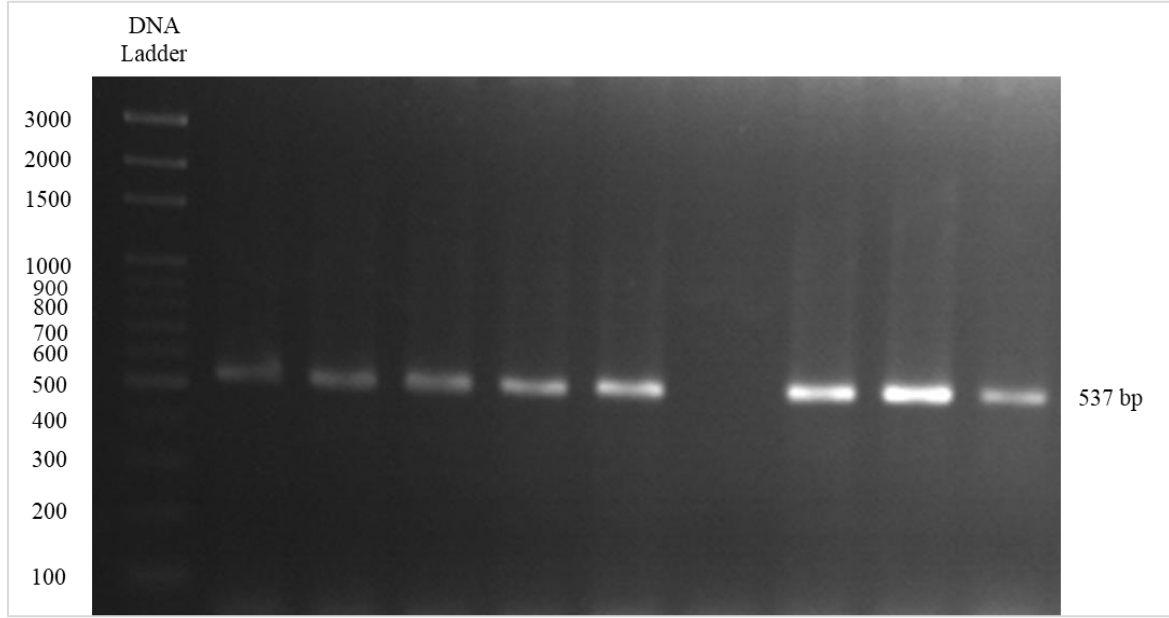
rs2058539



Şekil 4.3. rs2058539 SNP'ine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü.

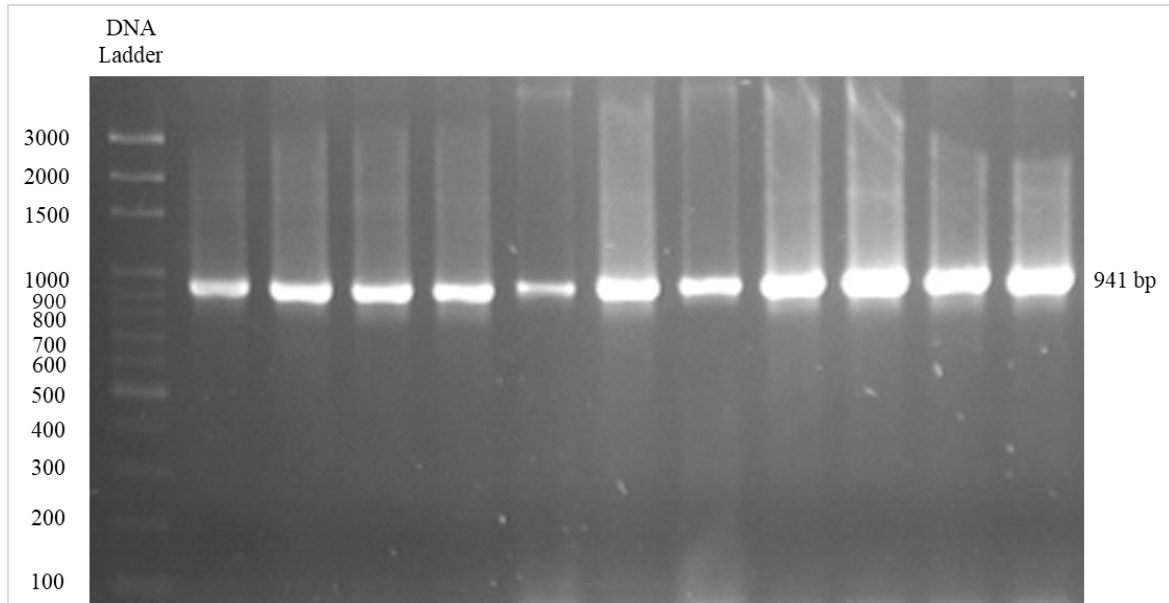
#### 4.3.2. *IL-6* genine ait SNP'lerin PCR jel görüntüleri

rs2069860



Şekil 4.4. rs2069860 SNP'ine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü.

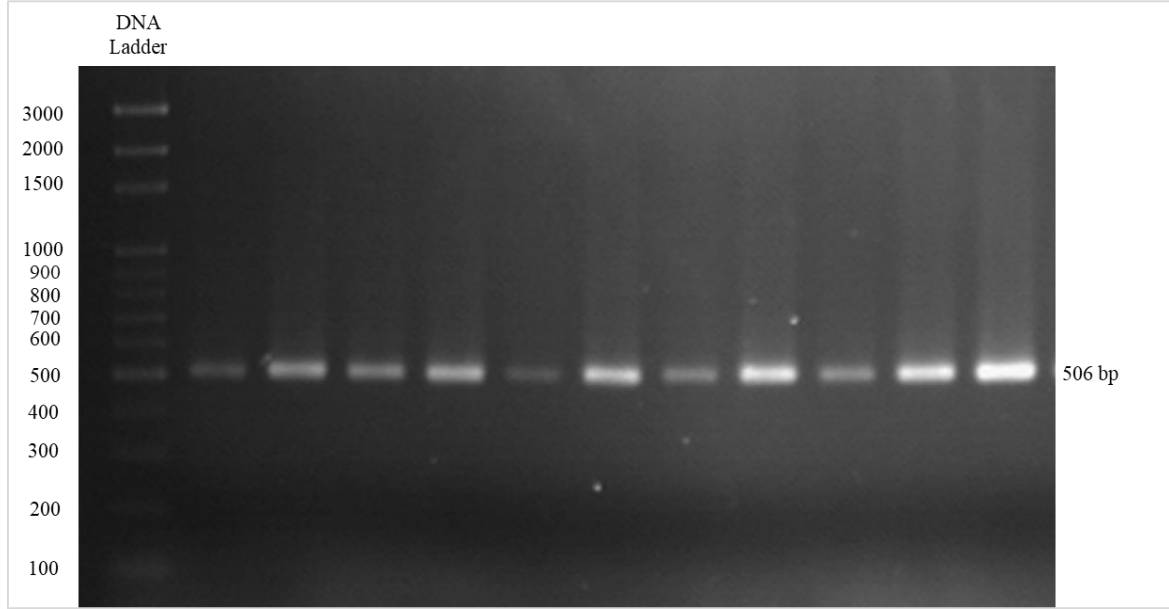
rs1554606



Şekil 4.5. rs1554606 SNP'ine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü.

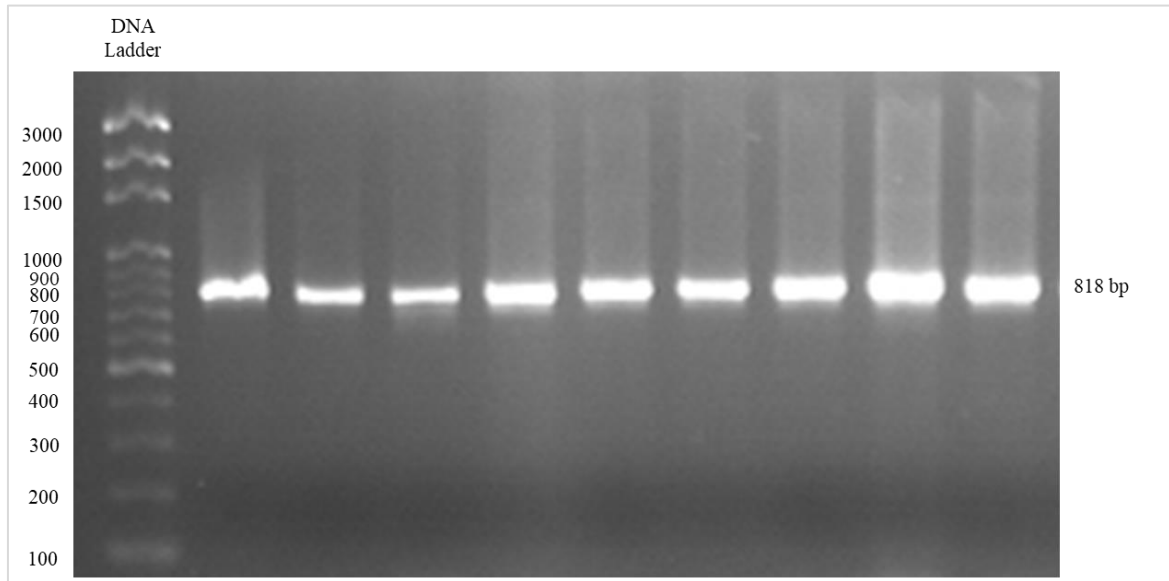
#### 4.3.3. *Vaspin* genine ait SNP'lerin PCR jel görüntüleri

rs77060950



Şekil 4.6. rs77060950 SNP'ine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü.

rs2236242



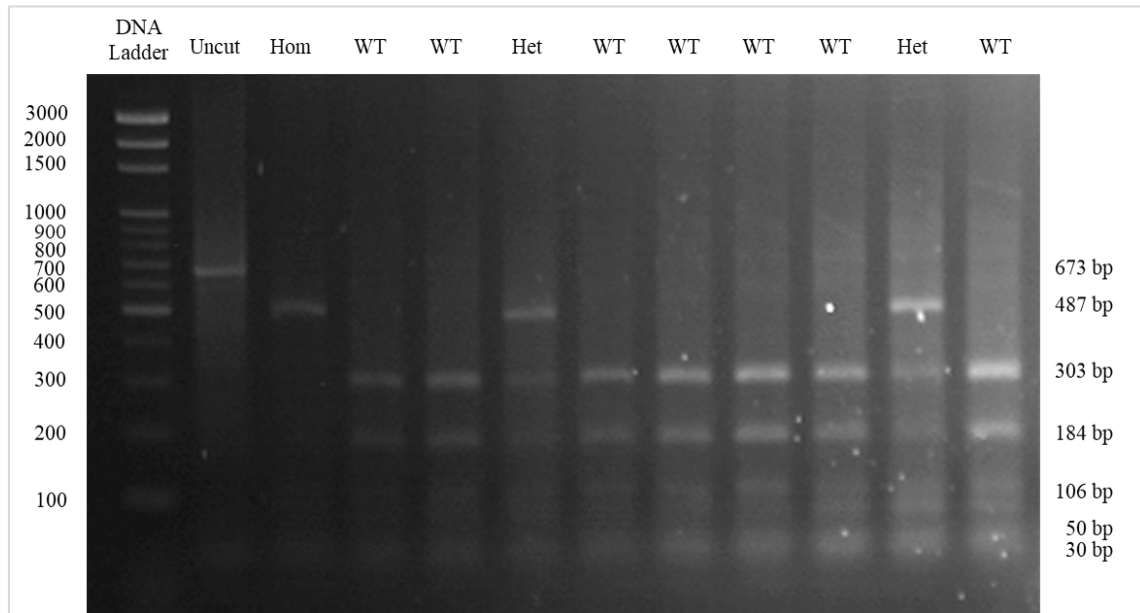
Şekil 4.7. rs2236242 SNP'ine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü.

### 4.3. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

#### 4.3.1. *NAMPT* genine ait SNP'lerin RFLP jel görüntüleri ve sonuçları

##### rs61330082

PCR ürünlerinin uygun enzimlerle kesilmesi ile RFLP sonuçları elde edilmiştir. PCR örnekleri rs61330082 için *MvaI* restriksiyon enzimi ile 2 saat muamele edildikten sonra jel elektroforezinde elde edilen kesim sonucu toplamda 6 ayrı bant görüntülenmiştir (Şekil 4.8). rs61330082 RFLP sonuçları gruplara göre yabanıl tip (wild-type, WT), homozigot ve heterozigotluk bakımından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.6).



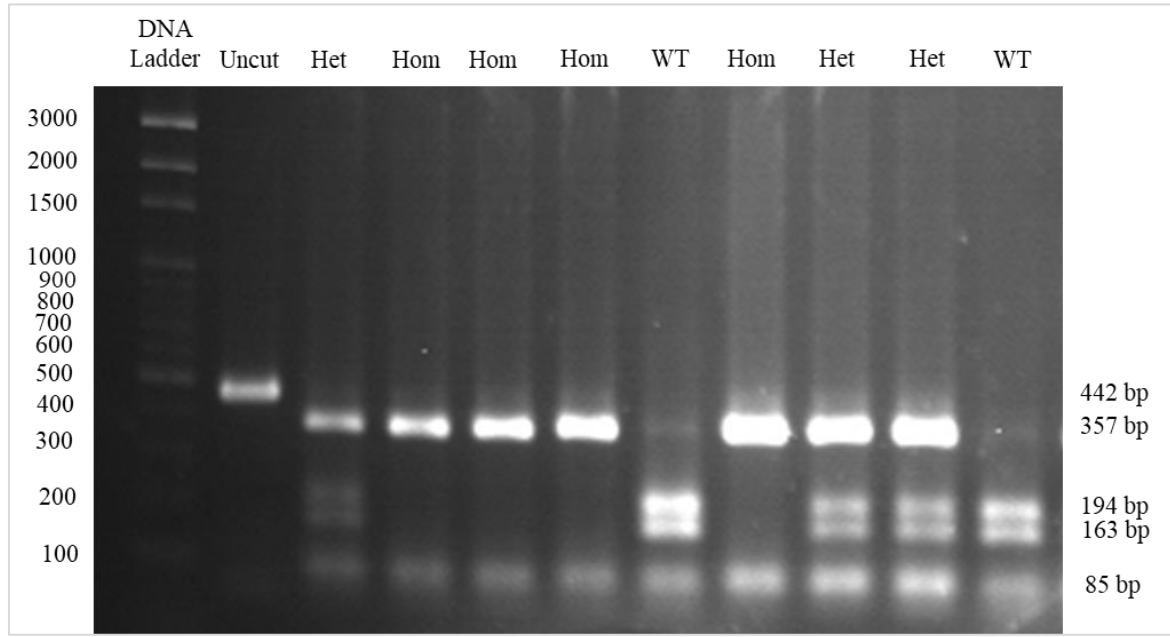
Şekil 4.8. rs61330082 SNP'ine ait RFLP ürünlerinin jel görüntüsü. Uncut: Enzim ile muamele edilmemiş PCR ürünü, WT: Yabanıl tip, Hom: Homozigot, Het: Heterozigot.

Çizelge 4.6. Gruplara göre rs61330082 SNP'inin RFLP ile elde edilen WT, homozigot, heterozigot sayıları.

| rs61330082 [G/A] |               |                                   |                                          |                                          |
|------------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                  | Kontrol Grubu | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu |
| WT (GG)          | 18            | 21                                | 20                                       | 18                                       |
| Heterozigot (GA) | 15            | 15                                | 16                                       | 17                                       |
| Homozigot (AA)   | 7             | 4                                 | 4                                        | 5                                        |
| Toplam           | 40            | 40                                | 40                                       | 40                                       |

### rs2058539

PCR örnekleri rs2058539 için HphI restriksiyon enzimi ile 16 saat (gece boyu) muamele edildikten sonra jel elektroforezinde elde edilen kesim sonucu toplamda 4 ayrı bant görüntülenmiştir (Şekil 4.9). rs2058539 RFLP sonuçları gruplara göre yabanıl tip (wild-type, WT), homozigot ve heterozigotluk bakımından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.7).



Şekil 4.9. rs2058539 SNP'ine ait RFLP ürünlerinin jel görüntüsü. Uncut: Enzim ile muamele edilmemiş PCR ürünü, WT: Yabanıl tip, Hom: Homozigot, Het: Heterozigot.

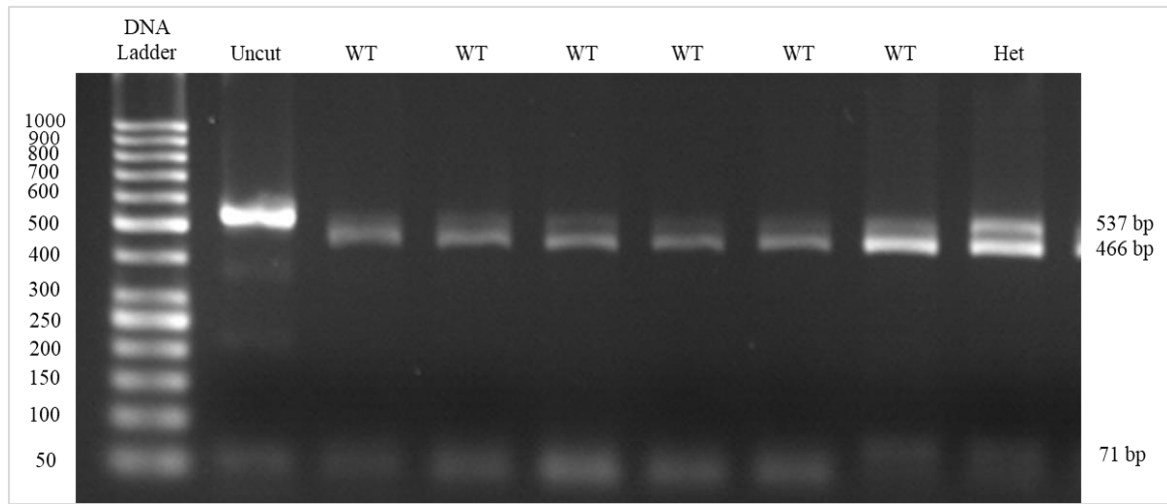
Çizelge 4.7. Gruplara göre rs2058539 SNP'inin RFLP ile elde edilen WT, homozigot, heterozigot sayıları.

| rs2058539 [C/A]  |               |                                   |                                          |                                          |
|------------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                  | Kontrol Grubu | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu |
| WT (CC)          | 1             | 3                                 | 1                                        | 2                                        |
| Heterozigot (CA) | 16            | 21                                | 28                                       | 24                                       |
| Homozigot (AA)   | 23            | 16                                | 11                                       | 14                                       |
| Toplam           | 40            | 40                                | 40                                       | 40                                       |

### 4.3.2. *IL-6* genine ait SNP'lerin RFLP jel görüntüleri ve sonuçları

#### rs2069860

PCR örnekleri rs2069860 için XbaI restriksiyon enzimi ile 3 saat muamele edildikten sonra jel elektroforezinde elde edilen kesim sonucu toplamda 3 ayrı bant görüntülenmiştir (Şekil 4.10). rs2069860 RFLP sonuçları gruplara göre yabanıl tip (wild-type, WT), homozigot ve heterozigotluk bakımından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.8).



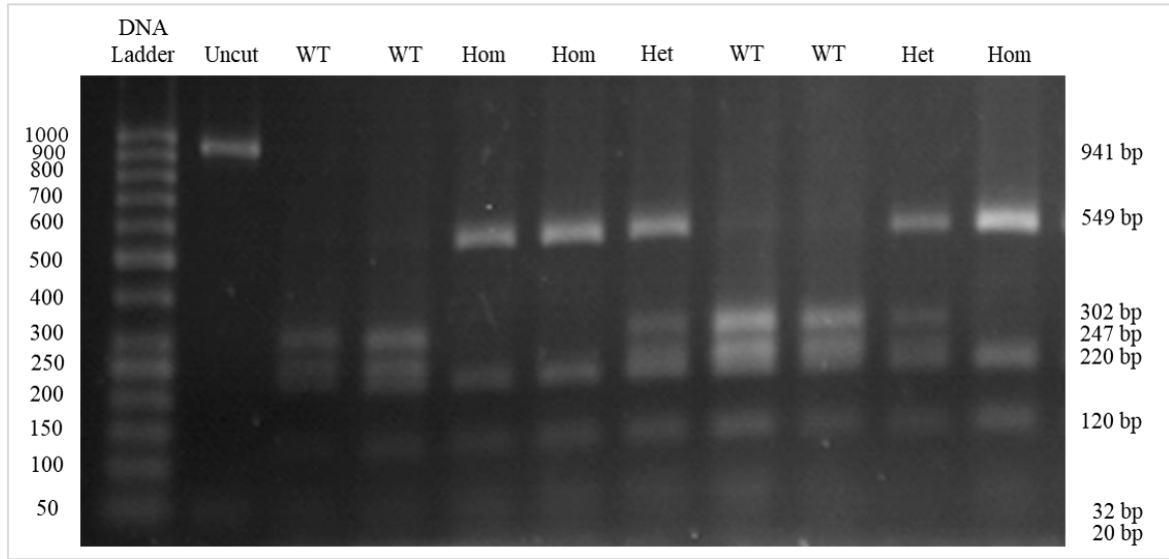
Şekil 4.10. rs2069860 SNP'ine ait RFLP ürünlerinin jel görüntüsü. Uncut: Enzim ile muamele edilmemiş PCR ürünü, WT: Yabanıl tip, Hom: Homozigot, Het: Heterozigot.

Çizelge 4.8. Gruplara göre rs2069860 SNP'inin RFLP ile elde edilen WT, homozigot, heterozigot sayıları.

|                  | rs2069860 [A/T] |                                   |                                          |                                          |
|------------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                  | Kontrol Grubu   | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu |
| WT (AA)          | 17              | 20                                | 22                                       | 26                                       |
| Heterozigot (AT) | 23              | 20                                | 18                                       | 14                                       |
| Homozigot (TT)   | -               | -                                 | -                                        | -                                        |
| Toplam           | 40              | 40                                | 40                                       | 40                                       |

### rs1554606

PCR örnekleri rs1554606 için DdeI restriksiyon enzimi ile 2 saat muamele edildikten sonra jel elektroforezinde elde edilen kesim sonucu toplamda 7 ayrı bant görüntülenmiştir (Şekil 4.11). rs1554606 RFLP sonuçları gruplara göre yabanıl tip (wild-type, WT), homozigot ve heterozigotluk bakımından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.9).



Şekil 4.11. rs1554606 SNP'ine ait RFLP ürünlerinin jel görüntüsü. Uncut: Enzim ile muamele edilmemiş PCR ürünü, WT: Yabanıl tip, Hom: Homozigot, Het: Heterozigot.

Çizelge 4.9. Gruplara göre rs1554606 SNP'inin RFLP ile elde edilen WT, homozigot, heterozigot sayıları.

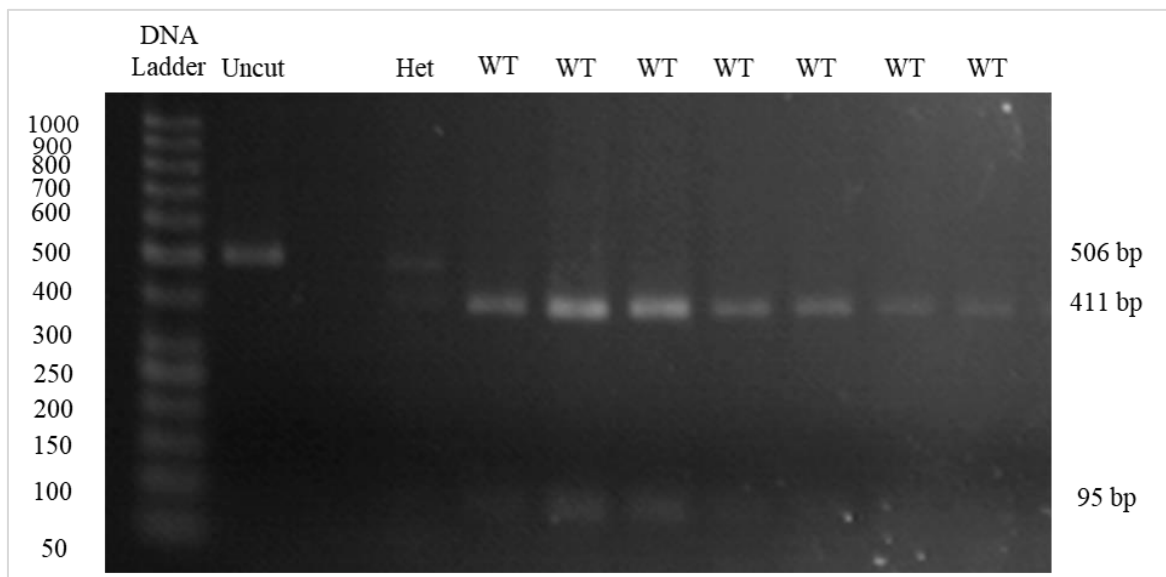
| rs1554606 [T/G]  |               |                                   |                                          |                                          |
|------------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                  | Kontrol Grubu | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu |
| WT (TT)          | 3             | -                                 | 5                                        | 3                                        |
| Heterozigot (TG) | 8             | 11                                | 9                                        | 14                                       |
| Homozigot (GG)   | 29            | 29                                | 26                                       | 23                                       |
| Toplam           | 40            | 40                                | 40                                       | 40                                       |



### 4.3.3. *Vaspin* genine ait SNP'lerin RFLP jel görüntüleri ve sonuçları

#### rs77060950

PCR örnekleri rs77060950 için MboI restriksiyon enzimi ile 2 saat muamele edildikten sonra jel elektroforezinde elde edilen kesim sonucu toplamda 3 ayrı bant görüntülenmiştir (Şekil 4.12). rs77060950 RFLP sonuçları gruplara göre yabanıl tip (wild-type, WT), homozigot ve heterozigotluk bakımından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.10).



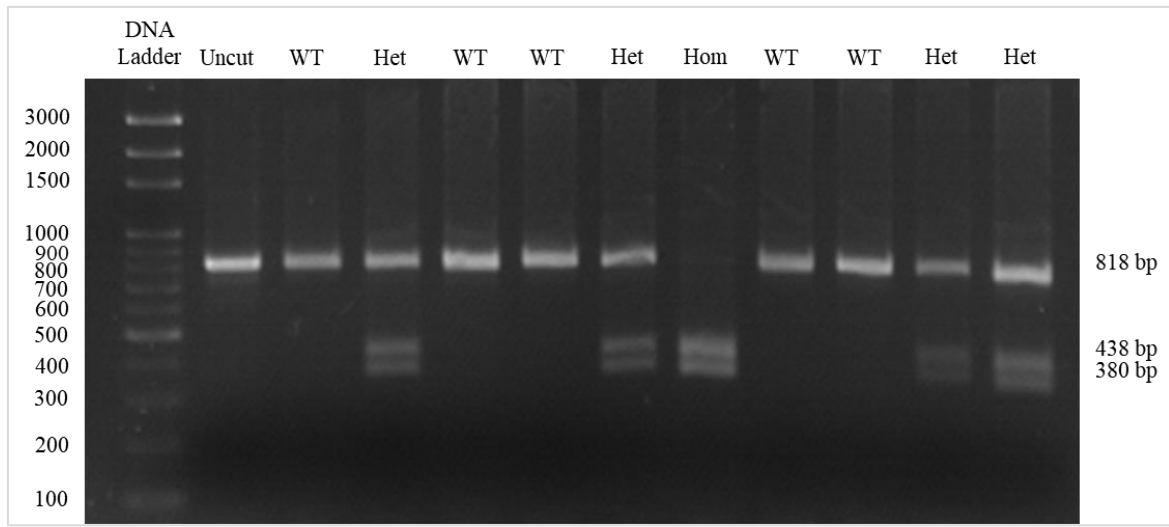
Şekil 4.12. rs77060950 SNP'ine ait RFLP ürünlerinin jel görüntüsü. Uncut: Enzim ile muamele edilmemiş PCR ürünü, WT: Yabanıl tip, Hom: Homozigot, Het: Heterozigot.

Çizelge 4.10. Gruplara göre rs77060950 SNP'inin RFLP ile elde edilen WT, homozigot, heterozigot sayıları.

| rs77060950 [G/T] |               |                                   |                                          |                                          |
|------------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                  | Kontrol Grubu | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu |
| WT (GG)          | 39            | 36                                | 32                                       | 36                                       |
| Heterozigot (GT) | 1             | 4                                 | 8                                        | 4                                        |
| Homozigot (TT)   | -             | -                                 | -                                        | -                                        |
| Toplam           | 40            | 40                                | 40                                       | 40                                       |

### rs2236242

PCR örnekleri rs2236242 için FspI restriksiyon enzimi ile 2 saat muamele edildikten sonra jel elektroforezinde elde edilen kesim sonucu toplamda 3 ayrı bant görüntülenmiştir (Şekil 4.13). rs2236242 RFLP sonuçları gruplara göre yabanıl tip (wild-type, WT), homozigot ve heterozigotluk bakımından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.11). FspI enzimi ile yapılan enzim kesiminde, kesim gerçekleşmediği zaman örneğin yabanıl tip olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.13).



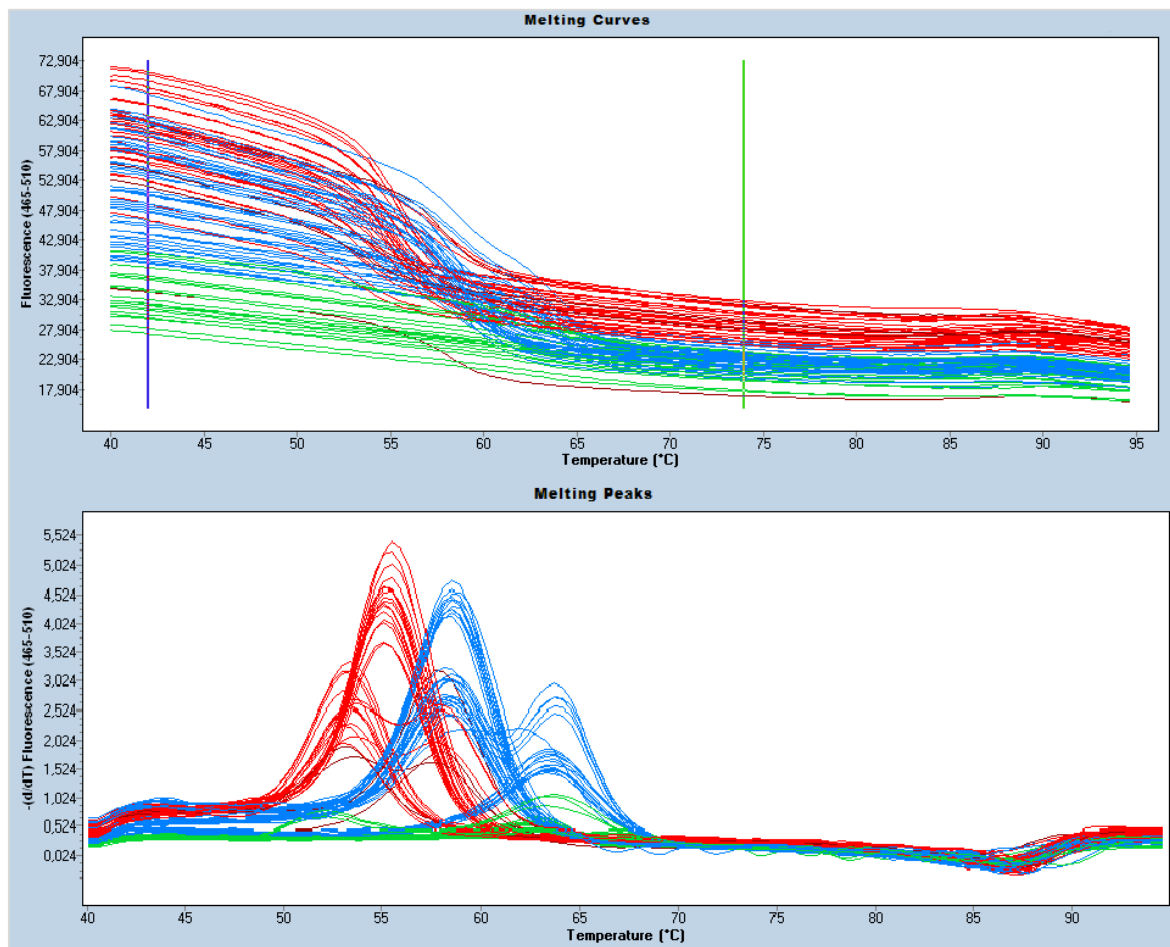
Şekil 4.13. rs2236242 SNP'ine ait RFLP ürünlerinin jel görüntüsü. Uncut: Enzim ile muamele edilmemiş PCR ürünü, WT: Yabanıl tip, Hom: Homozigot, Het: Heterozigot.

Çizelge 4.11. Gruplara göre rs2236242 SNP'inin RFLP ile elde edilen WT, homozigot, heterozigot sayıları.

| rs2236242 [T/A]  |               |                                   |                                          |                                          |
|------------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                  | Kontrol Grubu | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu |
| WT (TT)          | 24            | 22                                | 18                                       | 24                                       |
| Heterozigot (TA) | 13            | 15                                | 19                                       | 16                                       |
| Homozigot (AA)   | 3             | 3                                 | 3                                        | -                                        |
| Toplam           | 40            | 40                                | 40                                       | 40                                       |

#### 4.4. LightSNiP Assay ile Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR (qPCR))

LightSNiP Assay’de çalışılan 160 DNA örneği erime sıcaklıkları ile oluşturulan erime eğrisi ve erime piklerinin grafiği belirlenerek tek nükleotid polimorfizmleri bakımından incelenmiştir (Şekil 4.14). Her SNP için özel sıcaklıklarda pik veren LightSNiP Assay ile çalışma gruplarındaki allel sıklıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.12, Çizelge 4.13, Çizelge 4.14, Çizelge 4.15, Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17).



Şekil 4.14. Real-Time PCR (qPCR) sonucunda elde edilen rs61330082, rs2058539, rs2069860, rs1554606, rs77060950 ve rs2236242 SNP’lerinin erime eğrisi ve erime pikleri grafiği.

#### 4.4.1. NAMPT genine ait SNP'lerin Real-Time PCR sonuçları

Çizelge 4.12. Gruplara göre rs61330082 SNP'inin LightSNiP Assay ile elde edilen allel sayıları.

| rs61330082 [G/A] |               |                                   |                                          |                                          |
|------------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                  | Kontrol Grubu | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu |
| GG               | 19            | 21                                | 20                                       | 19                                       |
| GA               | 15            | 16                                | 17                                       | 18                                       |
| AA               | 6             | 3                                 | 3                                        | 3                                        |
| Toplam           | 40            | 40                                | 40                                       | 40                                       |

Çizelge 4.13. Gruplara göre rs2058539 SNP'inin LightSNiP Assay ile elde edilen allel sayıları.

| rs2058539 [C/A] |               |                                   |                                          |                                          |
|-----------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                 | Kontrol Grubu | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu |
| CC              | 2             | 5                                 | 4                                        | 4                                        |
| CA              | 15            | 20                                | 18                                       | 18                                       |
| AA              | 23            | 15                                | 18                                       | 18                                       |
| Toplam          | 40            | 40                                | 40                                       | 40                                       |

#### 4.4.2. IL-6 genine ait SNP'lerin Real-Time PCR sonuçları

Çizelge 4.14. Gruplara göre rs2069860 SNP'inin LightSNiP Assay ile elde edilen allel sayıları.

| rs2069860 [A/T] |               |                                   |                                          |                                          |
|-----------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                 | Kontrol Grubu | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu |
| AA              | 38            | 38                                | 38                                       | 39                                       |
| AT              | 2             | 2                                 | 2                                        | 1                                        |
| TT              | -             | -                                 | -                                        | -                                        |
| Toplam          | 40            | 40                                | 40                                       | 40                                       |

Çizelge 4.15. Gruplara göre rs1554606 SNP'inin LightSNiP Assay ile elde edilen allel sayıları.

| rs1554606 [T/G] |               |                                   |                                          |                                          |
|-----------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                 | Kontrol Grubu | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu |
| TT              | 3             | -                                 | 6                                        | 3                                        |
| TG              | 9             | 11                                | 8                                        | 14                                       |
| GG              | 28            | 29                                | 26                                       | 23                                       |
| Toplam          | 40            | 40                                | 40                                       | 40                                       |

#### 4.4.3. Vaspin genine ait SNP'lerin Real-Time PCR sonuçları

Çizelge 4.16. Gruplara göre rs77060950 SNP'inin LightSNiP Assay ile elde edilen allel sayıları.

| rs77060950 [G/T] |               |                                   |                                          |                                          |
|------------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                  | Kontrol Grubu | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu |
| GG               | 39            | 35                                | 36                                       | 36                                       |
| GT               | 1             | 5                                 | 4                                        | 4                                        |
| TT               | -             | -                                 | -                                        | -                                        |
| Toplam           | 40            | 40                                | 40                                       | 40                                       |

Çizelge 4.17. Gruplara göre rs2236242 SNP'inin LightSNiP Assay ile elde edilen allel sayıları.

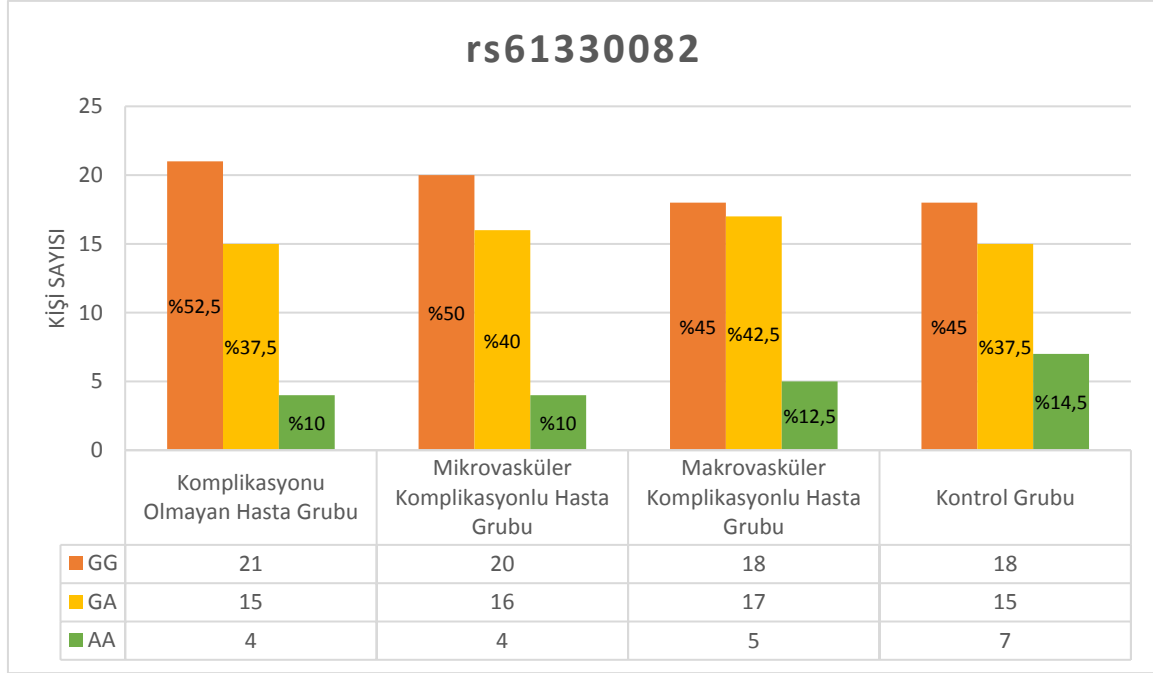
| rs2236242 [T/A] |               |                                   |                                          |                                          |
|-----------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                 | Kontrol Grubu | Komplikasyonu Olmayan Hasta Grubu | Mikrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu | Makrovasküler Komplikasyonlu Hasta Grubu |
| TT              | 24            | 22                                | 18                                       | 24                                       |
| TA              | 12            | 15                                | 19                                       | 16                                       |
| AA              | 4             | 3                                 | 3                                        | -                                        |
| Toplam          | 40            | 40                                | 40                                       | 40                                       |

#### 4.5. İstatistiksel Analizler

##### 4.5.1. PCR-RFLP bulgularının istatistiksel analizi

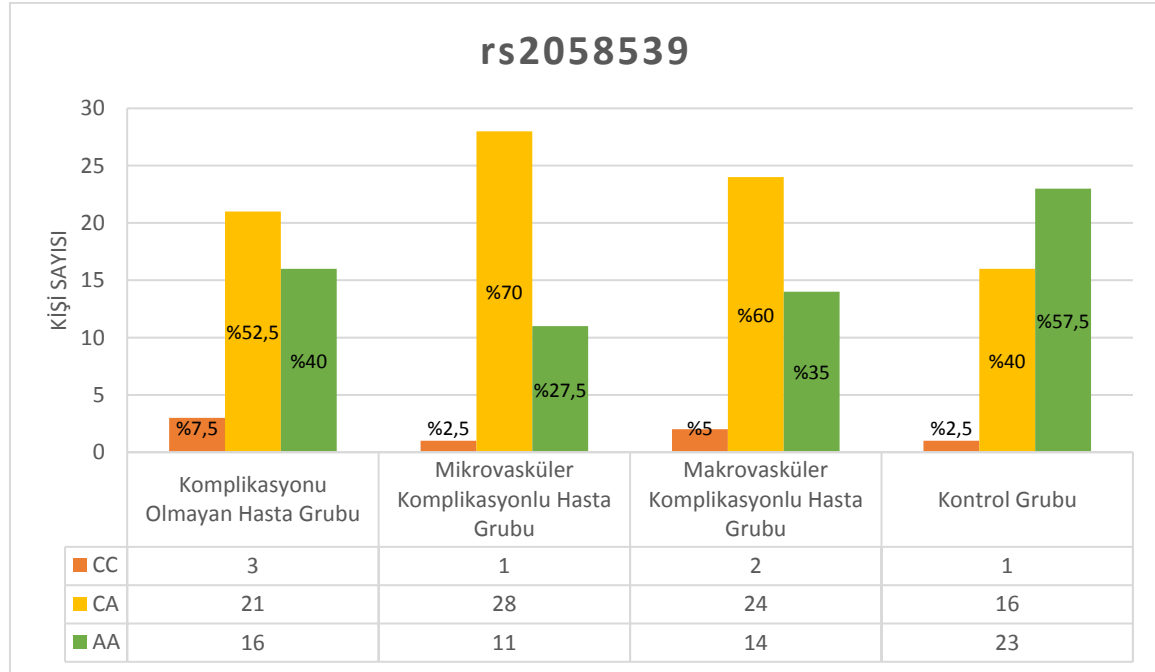
###### NAMPT geni

rs61330082 SNP'i için komplikasyonu olmayan hasta grubunda GG genotipine (WT) sahip birey sayısının 21 (sıklığı %52,5) olduğu belirlenmiştir. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda GG genotipe sahip 20 birey (sıklığı %50) bulunurken makrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda GG genotipine sahip birey sayısı 18'dir (sıklığı %45). Kontrol grubunda GG genotipi 18 bireyde (sıklığı %45) görülmüştür. Gruplara göre allel dağılımı ve sıklıkları Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15. rs61330082 SNP'inin çalışma gruplarına göre PCR-RFLP ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.

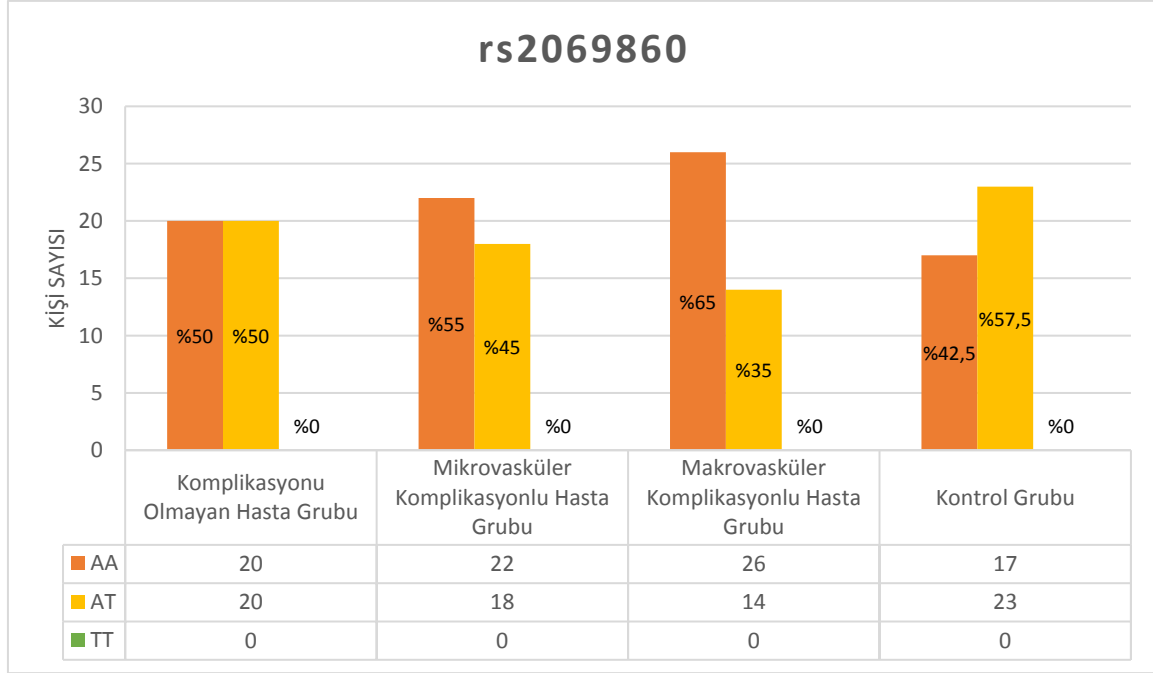
rs2058539 SNP'i için komplikasyonu olmayan hasta grubunda CA genotipine (heterozigot) sahip birey sayısının 21 (sıklığı %52,5) olduğu belirlenmiştir. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda CA genotipe sahip 28 birey (sıklığı %70) bulunurken makrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda CA genotipine sahip birey sayısı 24'tür (sıklığı %60). Kontrol grubunda ise AA genotipi (homozigot) 23 bireyde (sıklığı %57,5) görülmüştür. Gruplara göre allel dağılımı ve sıklıkları Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16. rs2058539 SNP'inin çalışma gruplarına göre PCR-RFLP ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.

#### IL-6 geni

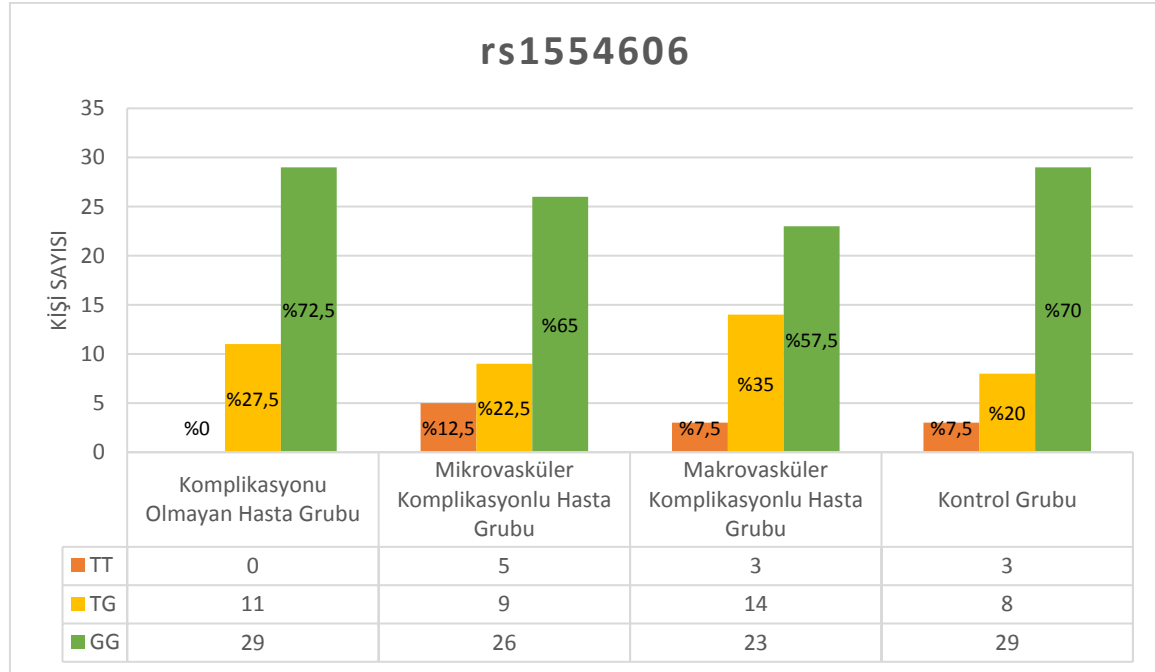
rs2069860 SNP'i için komplikasyonu olmayan hasta grubunda AA genotipine (WT) sahip birey sayısının 20 (sıklığı %50) olduğu belirlenmiştir. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda AA genotipe sahip 22 birey (sıklığı %55) bulunurken makrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda AA genotipine sahip birey sayısı 26'dır (sıklığı %65). Kontrol grubunda AT genotipi (heterozigot) 23 bireyde (sıklığı %57,5) görülmüştür. Gruplara göre allel dağılımı ve sıklıkları Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. rs2069860 SNP'inin çalışma gruplarına göre PCR-RFLP ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.

rs1554606 SNP'i için komplikasyonu olmayan hasta grubunda GG genotipine (homozigot) sahip birey sayısının 29 (sıklığı %72,5) olduğu belirlenmiştir. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda GG genotipe sahip 26 birey (sıklığı %65) bulunurken makrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda GG genotipine sahip birey sayısı 23'tür (sıklığı %57,5). Kontrol grubunda GG genotipi 29 bireyde (sıklığı %70) görülmüştür. Gruplara göre allel dağılımı ve sıklıkları Şekil 4.18'de verilmiştir.

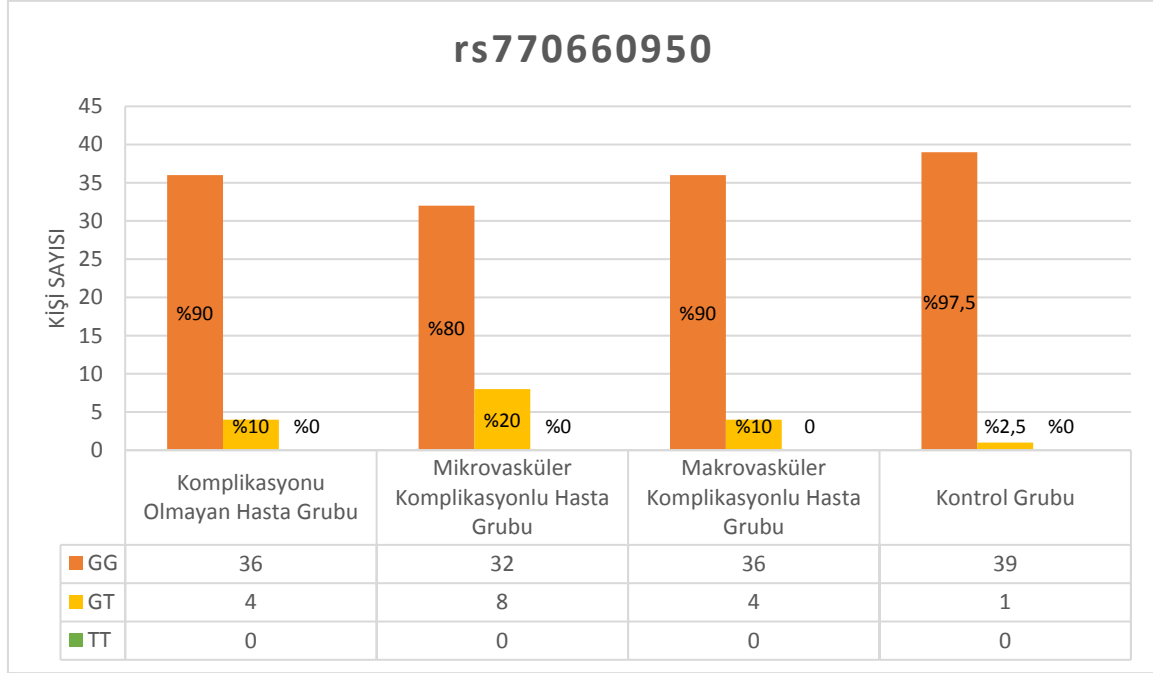




Şekil 4.18. rs1554606 SNP'inin çalışma gruplarına göre PCR-RFLP ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.

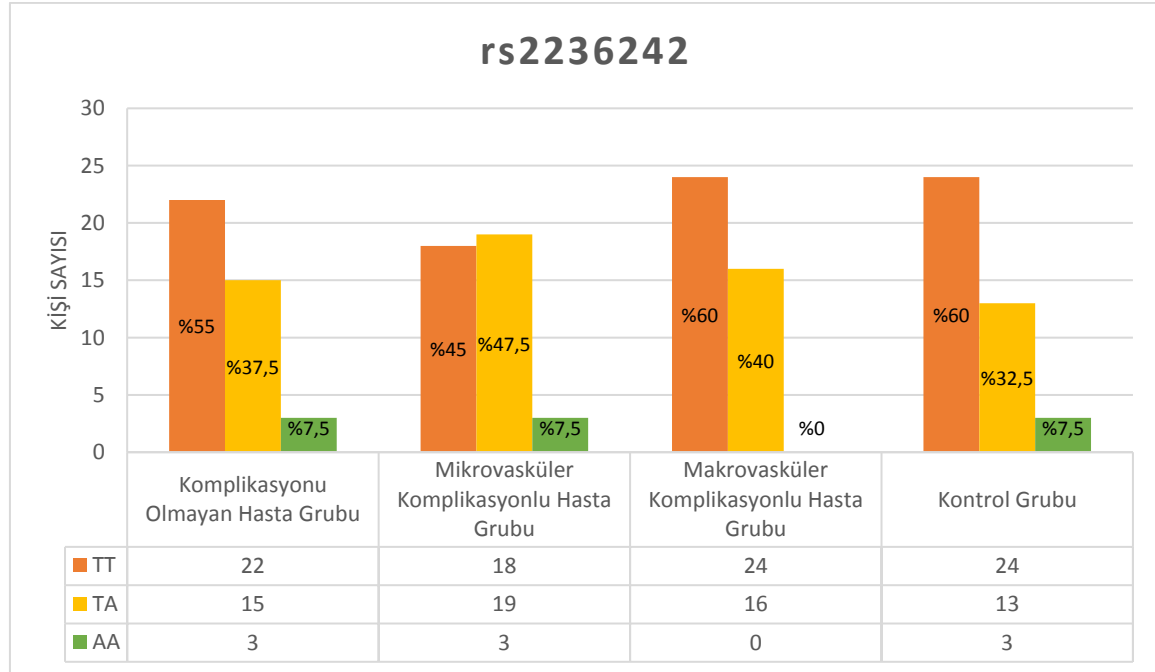
#### Vaspin geni

rs770660950 SNP'i için komplikasyonu olmayan hasta grubunda GG genotipine (WT) sahip birey sayısının 36 (sıklığı %90) olduğu belirlenmiştir. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda GG genotipe sahip 32 birey (sıklığı %80) bulunurken makrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda GG genotipine sahip birey sayısı 36'dır (sıklığı %90). Kontrol grubunda GG genotipi 39 bireyde (sıklığı %97,5) görülmüştür. Gruplara göre allel dağılımı ve sıklıkları Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. rs770660950 SNP'inin çalışma gruplarına göre PCR-RFLP ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.

rs2236242 SNP'i için komplikasyonu olmayan hasta grubunda TT genotipine (WT) sahip birey sayısının 22 (sıklığı %55) olduğu belirlenmiştir. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda TA genotipe (heterozigot) sahip 19 birey (sıklığı %47,5) bulunurken makrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda TT genotipine sahip birey sayısı 24'tür (sıklığı %60). Kontrol grubunda TT genotipi 24 bireyde (sıklığı %60) görülmüştür. Gruplara göre allel dağılımı ve sıklıkları Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. rs2236242 SNP'inin çalışma gruplarına göre PCR-RFLP ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.

#### SNP'lerin PCR-RFLP sonuçlarının gruplara göre olasılık oranı (OR) hesaplamaları

PCR-RFLP sonucu elde edilen veriler ile  $p$  değerleri ve olasılık oranları hesaplanmıştır (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. PCR-RFLP ile elde edilen genotip dağılımı, allel sıklığı,  $p$  değeri ve olasılık oranı (OR).

|            |          | Hasta Grupları<br>n = 120 |      | Kontrol Grubu<br>n = 40 |       | $p$   | OR (%95 CI)   |
|------------|----------|---------------------------|------|-------------------------|-------|-------|---------------|
| Genotip    |          | n                         | %    | n                       | %     |       |               |
| rs61330082 | GG       | 59                        | 49,2 | 18                      | 45    | 0,290 | 1,8 (0,6-5,1) |
|            | GA       | 48                        | 40   | 15                      | 37,5  | 0,322 | 1,7 (0,6-5,1) |
|            | AA       | 13                        | 10,8 | 7                       | 14,5  |       |               |
|            | G Alleli | 166                       | 69,2 | 51                      | 63,75 | 0,368 | 0,8 (0,5-1,3) |
|            | A Alleli | 74                        | 30,8 | 29                      | 36,25 |       |               |
| rs2058539  | CC       | 6                         | 5    | 1                       | 2,5   |       |               |
|            | CA       | 73                        | 60,8 | 16                      | 40    | 0,012 | 0,4 (0,2-0,8) |
|            | AA       | 41                        | 34,2 | 23                      | 57,5  |       |               |
|            | C Alleli | 85                        | 35,4 | 18                      | 22,5  | 0,032 | 0,5 (0,3-1,0) |
|            | A Alleli | 155                       | 64,6 | 62                      | 77,5  |       |               |
| rs2069860  | AA       | 68                        | 56,7 | 17                      | 42,5  | 0,119 | 0,6 (0,3-1,2) |
|            | AT       | 52                        | 43,3 | 23                      | 57,5  |       |               |
|            | TT       | -                         | -    | -                       | -     |       |               |
|            | A Alleli | 188                       | 78,3 | 57                      | 71,25 | 0,195 | 0,7 (0,4-1,2) |

Çizelge 4.18. (devam) PCR-RFLP ile elde edilen genotip dağılımı, allel sıklığı,  $p$  değeri ve olasılık oranı (OR).

|            |          |     |      |    |       |       |               |
|------------|----------|-----|------|----|-------|-------|---------------|
|            | T Alleli | 52  | 21,7 | 23 | 28,75 |       |               |
|            | TT       | 8   | 6,7  | 3  | 7,5   |       |               |
|            | TG       | 34  | 28,3 | 8  | 20    | 0,306 | 0,6 (0,3-1,5) |
| rs1554606  | GG       | 78  | 65   | 29 | 70    |       |               |
|            | T Alleli | 50  | 20,8 | 14 | 17,5  | 0,517 | 0,8 (0,4-1,6) |
|            | G Alleli | 190 | 79,2 | 66 | 82,5  |       |               |
|            | GG       | 104 | 86,7 | 39 | 97,5  |       |               |
| rs77060950 | GT       | 16  | 13,3 | 1  | 2,5   |       |               |
|            | TT       | -   | -    | -  | -     |       |               |
|            | G Alleli | 224 | 93,3 | 79 | 98,75 |       |               |
|            | T Alleli | 16  | 6,7  | 1  | 1,25  |       |               |
|            | TT       | 64  | 53,3 | 24 | 60    |       |               |
|            | TA       | 50  | 41,7 | 13 | 32,5  |       |               |
| rs2236242  | AA       | 6   | 5    | 3  | 7,5   |       |               |
|            | T Alleli | 178 | 74,2 | 61 | 76,25 | 0,708 | 1,1 (0,6-2,0) |
|            | A Alleli | 62  | 25,8 | 19 | 23,75 |       |               |

SNP'lerin PCR-RFLP sonuçlarının Hardy-Weinberg denkliği ile  $\chi^2$  testi hesaplamaları

PCR-RFLP bulguları için Hardy-Weinberg denkliği ile gerçekleştirilen  $\chi^2$  testi uygulanmıştır (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. PCR-RFLP bulgularına uygulanan  $\chi^2$  testi.

|            | Genotip | Gözlenen N<br>(n=160) | Beklenen N<br>(n=160) | $\chi^2$ | $p$ değeri |
|------------|---------|-----------------------|-----------------------|----------|------------|
|            | GG      | 77                    | 73,6                  |          |            |
| rs61330082 | GA      | 63                    | 69,9                  | 1,536    | 0,464      |
|            | AA      | 20                    | 16,6                  |          |            |
|            | CC      | 7                     | 16,6                  |          |            |
| rs2058539  | CA      | 89                    | 69,9                  | 12,028   | 0,002      |
|            | AA      | 64                    | 73,6                  |          |            |
|            | AA      | 85                    | 99,3                  |          |            |
| rs2069860  | AT      | 75                    | 60,7                  | 5,442    | 0,020      |
|            | TT      | -                     | -                     |          |            |
|            | TT      | 11                    | 6,4                   |          |            |
| rs1554606  | TG      | 42                    | 51,2                  | 5,166    | 0,076      |
|            | GG      | 107                   | 102,4                 |          |            |
|            | GG      | 143                   | 143,9                 |          |            |
| rs77060950 | GT      | 17                    | 16,1                  | 0,055    | 0,814      |
|            | TT      | -                     | -                     |          |            |
|            | TT      | 88                    | 89,3                  |          |            |
| rs2236242  | TA      | 63                    | 60,5                  | 0,274    | 0,872      |
|            | AA      | 9                     | 10,2                  |          |            |

### PCR-RFLP sonuçlarının referans ve alternatif allel yaygınlığı hesaplamaları

PCR-RFLP sonuçları ile hesaplanan referans ve alternatif allel yaygınlığına bakıldığında küresel ve Avrupa popülasyonu değerleri ile elde edilen değerler arasında belirgin farklar gözlenmiştir (Çizelge 4.20). Özellikle *IL-6* geninin her iki SNP'inde, *NAMPT* geninin rs2058539 SNP'inde ve *Vaspin* geninin rs2236242 SNP'inde referans ve alternatif allel yaygınlıklarında önemli ölçüde farklar olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.20).

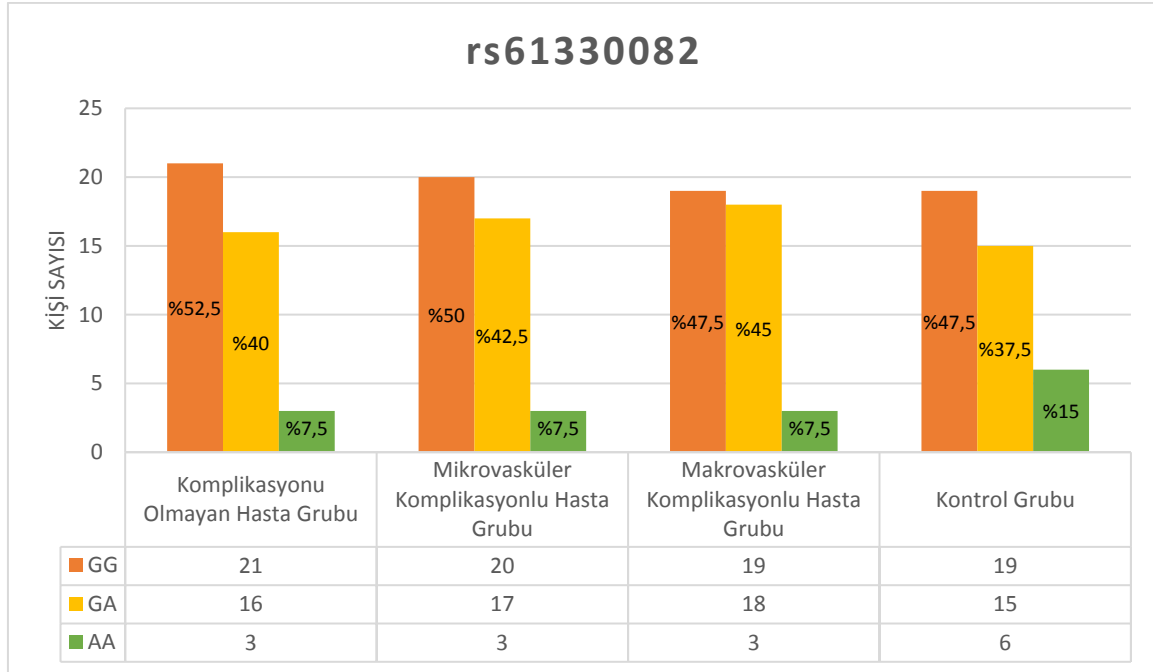
Çizelge 4.20 PCR-RFLP bulguları ile hesaplanan referans ve alternatif allel yaygınlıkları.

| Gen           | SNP        | Global  |          | Avrupa  |          | PCR-RFLP ile Hesaplanan |          |
|---------------|------------|---------|----------|---------|----------|-------------------------|----------|
|               |            | Ref Al. | Alt. Al. | Ref Al. | Alt. Al. | Ref Al.                 | Alt. Al. |
| <i>NAMPT</i>  | rs61330082 | G=0,789 | A=0,211  | G=0,757 | A=0,243  | G=0,678                 | A=0,322  |
|               | rs2058539  | C=0,443 | A=0,557  | C=0,459 | A=0,541  | C=0,322                 | A=0,678  |
| <i>IL-6</i>   | rs2069860  | A=0,993 | T=0,007  | A=0,992 | T=0,008  | A=0,766                 | T=0,234  |
|               | rs1554606  | T=0,417 | G=0,583  | T=0,434 | G=0,566  | T=0,200                 | G=0,800  |
| <i>Vaspin</i> | rs77060950 | G=0,973 | T=0,027  | G=0,988 | T=0,012  | G=0,956                 | T=0,044  |
|               | rs2236242  | T=0,650 | A=0,350  | T=0,600 | A=0,400  | T=0,744                 | A=0,256  |

#### 4.5.2. qPCR (LightSNiP Assay) bulgularının istatistiksel analizi

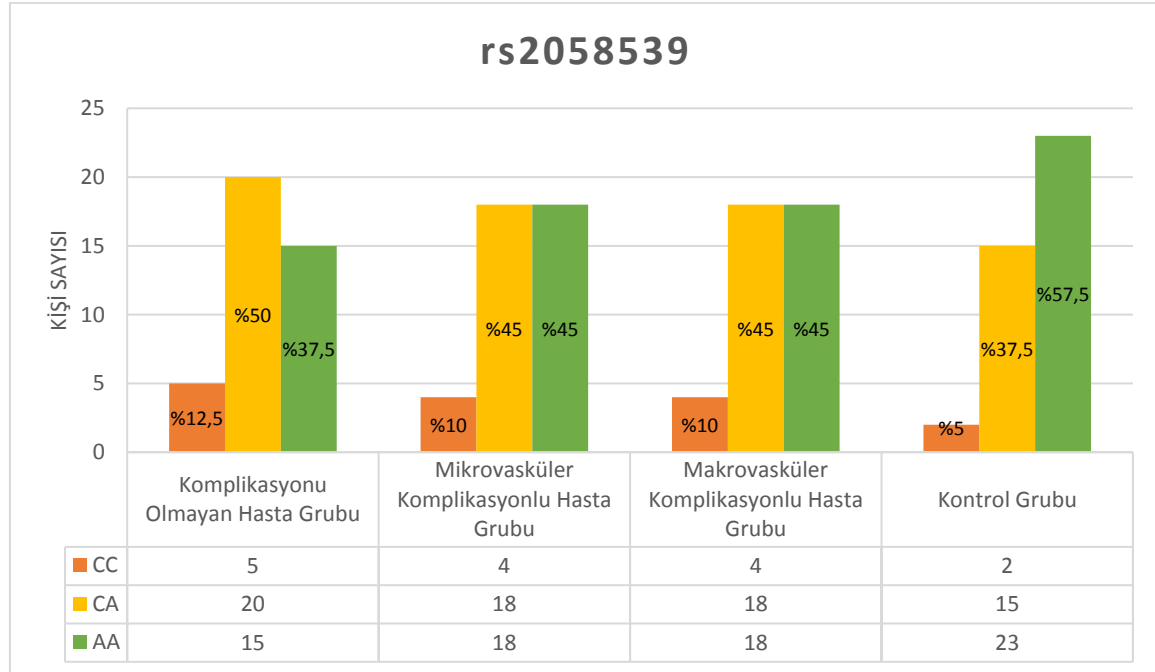
##### *NAMPT* geni

LightSNiP Assay ile yapılan analizde, rs61330082 SNP'i için komplikasyonu olmayan hasta grubunda GG genotipine (WT) sahip birey sayısının 21 (sıklığı %52,5) olduğu belirlenmiştir. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda GG genotipe sahip 20 birey (sıklığı %50) bulunurken makrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda GG genotipine sahip birey sayısı 19'dur (sıklığı %47,5). Kontrol grubunda GG genotipi 19 bireyde (sıklığı %47,5) görülmüştür. Gruplara göre allel dağılımı ve sıklıkları Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.21. rs61330082 SNP'inin çalışma gruplarına göre qPCR ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.

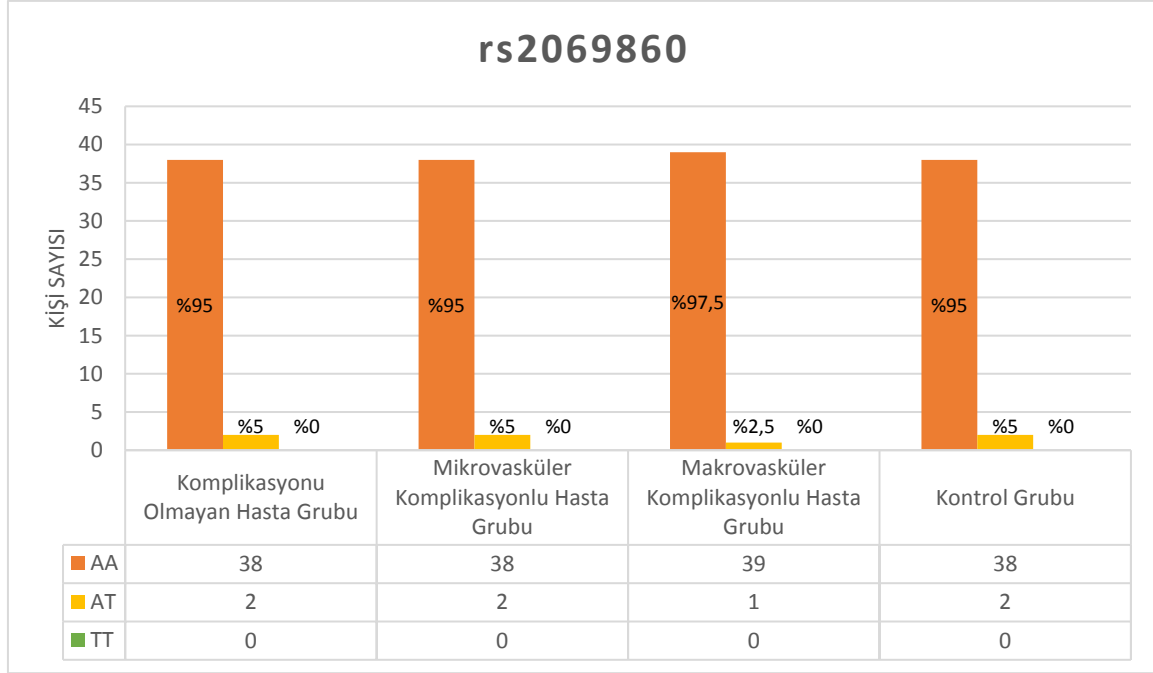
rs2058539 SNP'i için komplikasyonu olmayan hasta grubunda CA genotipine (heterozigot) sahip birey sayısının 20 (sıklığı %50) olduğu belirlenmiştir. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda CA genotipe sahip 18 birey (sıklığı %45) bulunurken makrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda CA genotipine sahip birey sayısı 18'dir (sıklığı %45). Kontrol grubunda ise AA genotipi (homozigot) 23 bireyde (sıklığı %57,5) görülmüştür. Gruplara göre allel dağılımı ve sıklıkları Şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.22. rs2058539 SNP'inin çalışma gruplarına göre qPCR ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.

#### IL-6 geni

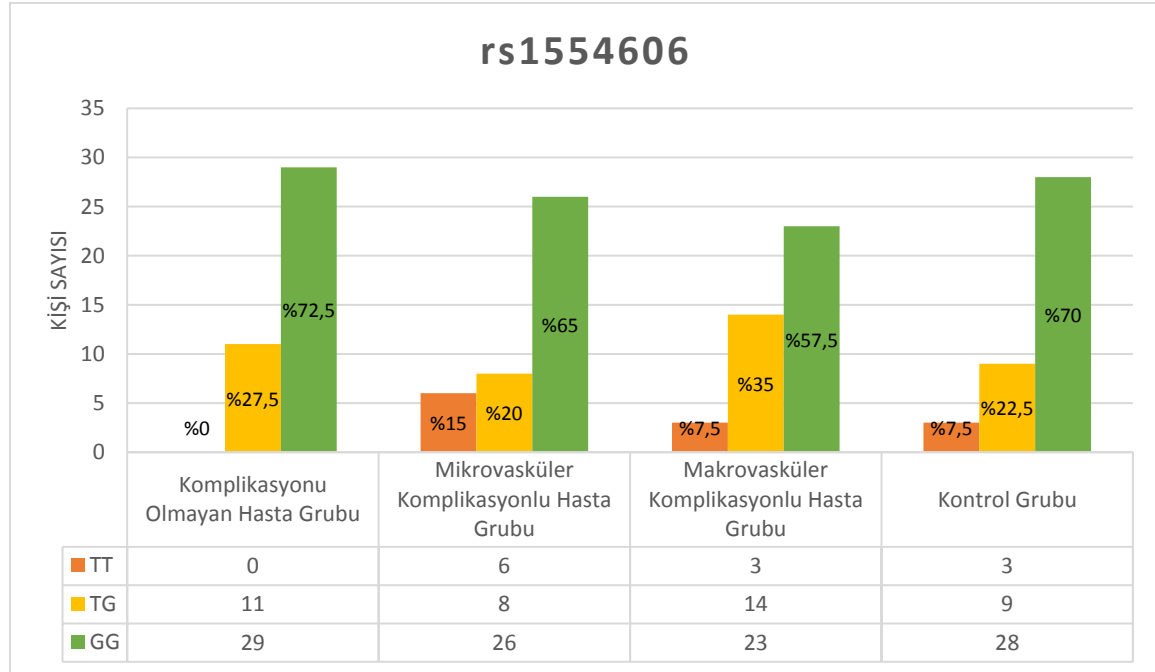
rs2069860 SNP'i için komplikasyonu olmayan hasta grubunda AA genotipine (WT) sahip birey sayısının 38 (sıklığı %95) olduğu belirlenmiştir. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda AA genotipe sahip 38 birey (sıklığı %95) bulunurken makrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda AA genotipine sahip birey sayısı 39'dur (sıklığı %97,5). Kontrol grubunda AA genotipi 38 bireyde (sıklığı %95) görülmüştür. Gruplara göre allel dağılımı ve sıklıkları Şekil 4.23'te verilmiştir.



Şekil 4.23. rs2069860 SNP'inin çalışma gruplarına göre qPCR ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.

rs1554606 SNP'i için komplikasyonu olmayan hasta grubunda GG genotipine (homozigot) sahip birey sayısının 29 (sıklığı %72,5) olduğu belirlenmiştir. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda GG genotipe sahip 26 birey (sıklığı %65) bulunurken makrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda GG genotipine sahip birey sayısı 23'tür (sıklığı %57,5). Kontrol grubunda GG genotipi 28 bireyde (sıklığı %70) görülmüştür. Gruplara göre allel dağılımı ve sıklıkları Şekil 4.24'te verilmiştir.

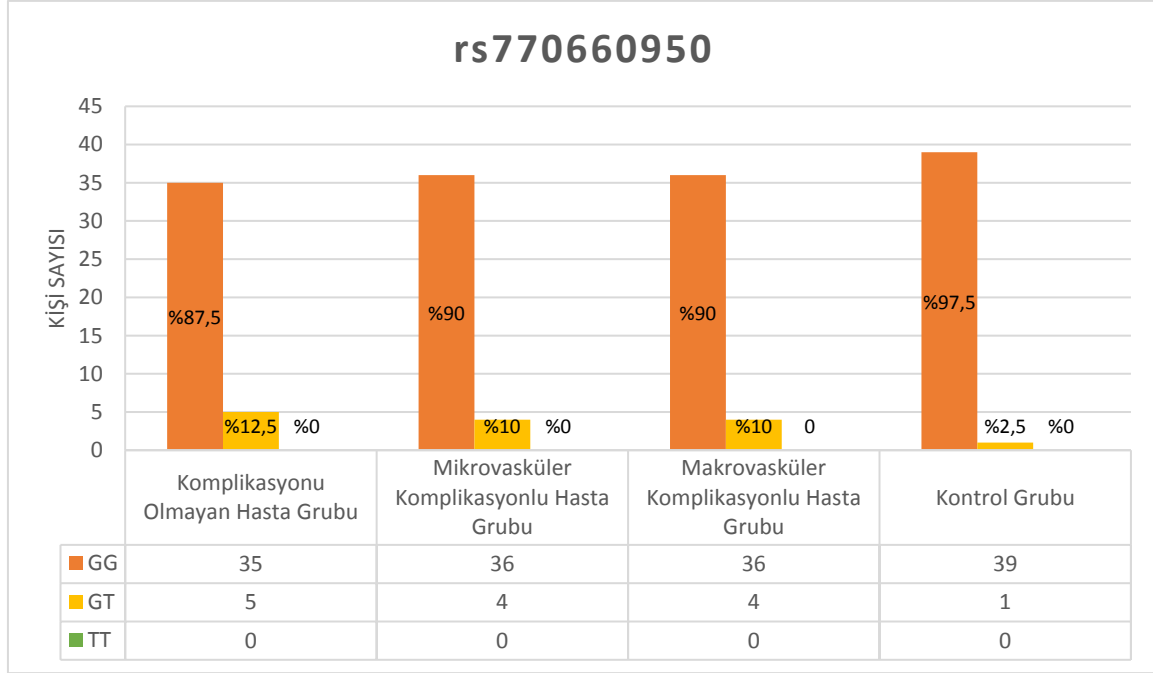




Şekil 4.24. rs1554606 SNP'inin çalışma gruplarına göre qPCR ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.

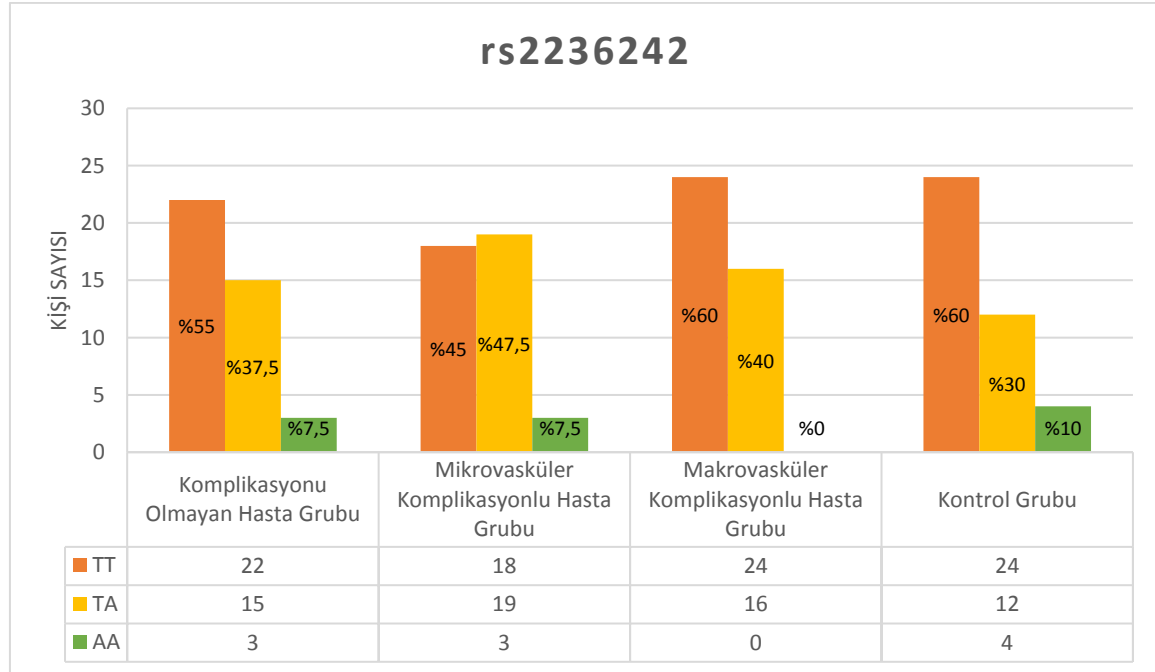
#### Vaspin geni

rs770660950 SNP'i için komplikasyonu olmayan hasta grubunda GG genotipine (WT) sahip birey sayısının 35 (sıklığı %87,5) olduğu belirlenmiştir. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda GG genotipe sahip 36 birey (sıklığı %90) bulunurken makrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda GG genotipine sahip birey sayısı 36'dır (sıklığı %90). Kontrol grubunda GG genotipi 39 bireyde (sıklığı %97,5) görülmüştür. Gruplara göre allel dağılımı ve sıklıkları Şekil 4.25'te verilmiştir.



Şekil 4.25. rs770660950 SNP'inin çalışma gruplarına göre qPCR ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.

rs2236242 SNP'i için komplikasyonu olmayan hasta grubunda TT genotipine (WT) sahip birey sayısının 22 (sıklığı %55) olduğu belirlenmiştir. Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda TA genotipe (heterozigot) sahip 19 birey (sıklığı %47,5) bulunurken makrovasküler komplikasyonlu hasta grubunda TT genotipine sahip birey sayısı 24'tür (sıklığı %60). Kontrol grubunda TT genotipi 24 bireyde (sıklığı %60) görülmüştür. Gruplara göre allel dağılımı ve sıklıkları Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.26. rs2236242 SNP'inin çalışma gruplarına göre qPCR ile elde edilen allel dağılımının ve sıklığının grafiği.

#### SNP'lerin qPCR sonuçlarının gruplara göre olasılık oranı (OR) hesaplamaları

Real-Time PCR (qPCR) sonucu elde edilen veriler ile  $p$  değerleri ve olasılık oranları hesaplanmıştır (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21. Real-Time PCR (qPCR) ile elde edilen genotip dağılımı, allel sıklığı,  $p$  değeri ve olasılık oranı (OR).

|            |          | Hasta Grupları<br>n = 120 |       | Kontrol Grubu<br>n = 40 |       | $p$   | OR (%95<br>CI)    |
|------------|----------|---------------------------|-------|-------------------------|-------|-------|-------------------|
| Genotip    |          | n                         | %     | n                       | %     |       |                   |
| rs61330082 | GG       | 60                        | 50    | 19                      | 47,5  | 0,399 | 0,5 (0,1-<br>1,5) |
|            | GA       | 51                        | 42,5  | 15                      | 37,5  |       |                   |
|            | AA       | 9                         | 7,5   | 6                       | 15    |       |                   |
|            | G Alleli | 171                       | 71,25 | 53                      | 66,25 |       |                   |
| rs2058539  | A Alleli | 69                        | 28,25 | 27                      | 33,75 | 0,173 | 0,8 (0,5-<br>1,4) |
|            | CC       | 13                        | 10,8  | 2                       | 5     |       |                   |
|            | CA       | 56                        | 46,7  | 15                      | 37,5  |       |                   |
|            | AA       | 51                        | 42,5  | 23                      | 57,5  |       |                   |
| rs2058539  | C Alleli | 82                        | 32,2  | 19                      | 23,75 | 0,083 | 0,6 (0,3-<br>1,1) |
|            | A Alleli | 158                       | 65,8  | 61                      | 76,25 |       |                   |

Çizelge 4.21. (devam) Real-Time PCR (qPCR) ile elde edilen genotip dağılımı, allel sıklığı,  $p$  değeri ve olasılık oranı (OR).

|            |          |     |       |    |       |       |               |
|------------|----------|-----|-------|----|-------|-------|---------------|
| rs2069860  | AA       | 115 | 95,8  | 38 | 95    |       |               |
|            | AT       | 5   | 4,2   | 2  | 5     |       |               |
|            | TT       | -   | -     | -  | -     |       |               |
|            | A Alleli | 235 | 97,9  | 78 | 97,5  |       |               |
|            | T Alleli | 5   | 2,1   | 2  | 2,5   |       |               |
| rs1554606  | TT       | 9   | 7,5   | 3  | 7,5   | 0,527 | 0,8 (0,3-1,8) |
|            | TG       | 33  | 27,5  | 9  | 22,5  |       |               |
|            | GG       | 78  | 65    | 28 | 70    |       |               |
|            | T Alleli | 51  | 21,25 | 15 | 18,75 |       |               |
|            | G Alleli | 189 | 78,75 | 65 | 81,25 |       |               |
| rs77060950 | GG       | 107 | 89,2  | 39 | 97,5  |       |               |
|            | GT       | 13  | 10,8  | 1  | 2,5   |       |               |
|            | TT       | -   | -     | -  | -     |       |               |
|            | G Alleli | 227 | 94,6  | 79 | 98,75 |       |               |
|            | T Alleli | 13  | 5,4   | 1  | 1,25  |       |               |
| rs2236242  | TT       | 64  | 53,3  | 24 | 60    | 0,887 | 1,0 (0,6-1,9) |
|            | TA       | 50  | 41,7  | 12 | 30    |       |               |
|            | AA       | 6   | 5     | 4  | 10    |       |               |
|            | T Alleli | 178 | 74,2  | 60 | 75    |       |               |
|            | A Alleli | 62  | 25,8  | 20 | 25    |       |               |

#### SNP'lerin qPCR sonuçlarının Hardy-Weinberg denkleği ile $\chi^2$ testi hesaplamaları

Real-Time PCR (qPCR) bulguları için Hardy-Weinberg denkleği ile gerçekleştirilen  $\chi^2$  testi uygulanmıştır (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22. Real-Time PCR (qPCR) bulgularına uygulanan  $\chi^2$  testi.

|            | Genotip | Gözlenen N<br>(n=160) | Beklenen N<br>(n=160) | $\chi^2$ | $p$ değeri |
|------------|---------|-----------------------|-----------------------|----------|------------|
| rs61330082 | GG      | 79                    | 78,4                  | 0,051    | 0,975      |
|            | GA      | 66                    | 67,2                  |          |            |
|            | AA      | 15                    | 14,4                  |          |            |
|            | CC      | 15                    | 16,0                  |          |            |
| rs2058539  | CA      | 71                    | 69,2                  | 0,118    | 0,943      |
|            | AA      | 74                    | 74,9                  |          |            |
|            | AA      | 153                   | 153,1                 |          |            |
| rs2069860  | AT      | 7                     | 6,9                   | 0,002    | 0,964      |
|            | TT      | -                     | -                     |          |            |
|            | TT      | 12                    | 6,8                   |          |            |
| rs1554606  | TG      | 42                    | 52,3                  | 6,301    | 0,043      |
|            | GG      | 106                   | 100,9                 |          |            |
|            | GG      | 146                   | 146,5                 |          |            |
| rs77060950 | GT      | 14                    | 13,5                  | 0,021    | 0,884      |
|            | TT      | -                     | -                     |          |            |
|            | TT      | 88                    | 88,6                  |          |            |
| rs2236242  | TA      | 62                    | 60,9                  | 0,045    | 0,978      |
|            | AA      | 10                    | 10,5                  |          |            |

### qPCR sonuçlarının referans ve alternatif allel yaygınlığı hesaplamaları

LightSNiP Assay ile gerçekleştirilen Real-Time PCR sonuçları ile hesaplanan referans ve alternatif allel yaygınlığına bakıldığında küresel ve Avrupa popülasyonu değerleri ile elde edilen değerler arasında belirgin farklar gözlenmiştir (Çizelge 4.23). *NAMPT* geninin rs2058539 SNP'inde, *IL-6* geninin rs1554606 SNP'inde ve *Vaspin* geninin rs2236242 SNP'inde referans ve alternatif allel yaygınlıklarında önemli ölçüde farklar olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.23. qPCR bulguları ile hesaplanan referans ve alternatif allel yaygınlıkları.

| Gen           | SNP        | Global  |          | Avrupa  |          | Real-Time PCR ile Hesaplanan |          |
|---------------|------------|---------|----------|---------|----------|------------------------------|----------|
|               |            | Ref Al. | Alt. Al. | Ref Al. | Alt. Al. | Ref Al.                      | Alt. Al. |
| <i>NAMPT</i>  | rs61330082 | G=0,789 | A=0,211  | G=0,757 | A=0,243  | G=0,700                      | A=0,300  |
|               | rs2058539  | C=0,443 | A=0,557  | C=0,459 | A=0,541  | C=0,316                      | A=0,684  |
| <i>IL-6</i>   | rs2069860  | A=0,993 | T=0,007  | A=0,992 | T=0,008  | A=0,978                      | T=0,022  |
|               | rs1554606  | T=0,417 | G=0,583  | T=0,434 | G=0,566  | T=0,206                      | G=0,794  |
| <i>Vaspin</i> | rs77060950 | G=0,973 | T=0,027  | G=0,988 | T=0,012  | G=0,947                      | T=0,053  |
|               | rs2236242  | T=0,650 | A=0,350  | T=0,600 | A=0,400  | T=0,747                      | A=0,253  |

### Haplotip sıklığı hesaplamaları

Kromozom 7 üzerinde bulunan *NAMPT* ve *IL-6* genlerinin tek nükleotid polimorfizmlerinin sonuçları ile gözlenen haplotiplerin sıklıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.24 ve Şekil 4.27). En yaygın haplotip olan Haplotip1 (G A A G) kontrol grubunda 0.31 sıklıkla görülürken diğer 3 hasta grubunda da bu oran 0.27'dir (Çizelge 4.24). Haplotip2 ise 0.22 sıklıkla en çok komplikasyonu olmayan hasta grubunda, 0.16 sıklıkla en az kontrol grubunda görülmüştür.

Çizelge 4.24. Çalışma gruplarına göre haplotip sıklıkları.

| Haplotip   |         | Komplikasyonu olmayan hasta grubu | Mikrovasküler komplikasyonlu hasta grubu | Makrovasküler komplikasyonlu hasta grubu | Kontrol Grubu |
|------------|---------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|---------------|
| Haplotip1  | G A A G | 0.27                              | 0.27                                     | 0.27                                     | 0.31          |
| Haplotip2  | G C A G | 0.22                              | 0.17                                     | 0.18                                     | 0.16          |
| Haplotip3  | A A A G | 0.16                              | 0.16                                     | 0.16                                     | 0.18          |
| Haplotip4  | G C A T | 0.09                              | 0.08                                     | 0.09                                     | 0.06          |
| Haplotip5  | G A A T | 0.05                              | 0.11                                     | 0.13                                     | 0.11          |
| Haplotip6  | A A A T | 0.04                              | 0.09                                     | 0.09                                     | 0.07          |
| Haplotip7  | A C A G | 0.07                              | 0.05                                     | 0.05                                     | 0.05          |
| Haplotip8  | A C A T | 0.03                              | 0.06                                     | 0.03                                     | 0.03          |
| Haplotip9  | G C T G | 0.01                              | 0.01                                     | 0.01                                     | 0.02          |
| Haplotip10 | G A T G | 0.01                              | -                                        | -                                        | 0.01          |
| Haplotip11 | G C T T | 0.01                              | 0.01                                     | -                                        | -             |
| Haplotip12 | A A T G | 0.02                              | -                                        | -                                        | -             |
| Haplotip13 | G A T T | 0.01                              | -                                        | -                                        | -             |
| Haplotip14 | A A T T | 0.01                              | -                                        | -                                        | -             |
| Haplotip15 | A C T G | 0.01                              | -                                        | -                                        | -             |
| Haplotip16 | A C T T | 0.01                              | -                                        | -                                        | -             |

| RS Number           | Position (GRCh37) | Allele Frequencies | Haplotypes |       |       |       |       |       |       |
|---------------------|-------------------|--------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| rs1554606           | chr7:22768707     | T=0.20, G=0.80     | T          | G     | T     | G     | T     | G     | T     |
| rs2069860           | chr7:22771038     | A=0.98, T=0.02     | A          | A     | A     | A     | A     | A     | T     |
| rs2058539           | chr7:105916637    | A=0.684, C=0.316   | C          | A     | A     | C     | A     | A     | A     |
| rs61330082          | chr7:105926865    | G=0.700, A=0.300   | G          | G     | A     | G     | G     | A     | G     |
| Haplotype Count     |                   |                    | 29         | 89    | 24    | 62    | 31    | 52    | 1     |
| Haplotype Frequency |                   |                    | 0.088      | 0.271 | 0.073 | 0.188 | 0.094 | 0.158 | 0.003 |

Şekil 4.27. Hasta gruplarına göre haplotip sıklıkları.



## 5. TARTIŞMA

Adipokin ya da adipositokin gibi adipoz doku kaynaklı faktörlerin glikoz ile yağ metabolizması üzerine etkileri olduğu ve tip 2 diyabet, insülin direnci, kardiyovasküler hastalıklar ve obezite gelişiminde kritik rol oynadığı düşünülmektedir [44, 49, 129-131].

NAMPT ile ilgili yapılan birçok çalışmada plazma NAMPT seviyelerinin tip 2 diyabet ile ilişkili olduğu gözlenmiştir [44, 132-135]. Kafkas kökenli bireyler ile gerçekleştirilen çalışmada ilerleyen beta hücresi bozukluğu ile birlikte serum NAMPT seviyelerinin arttığı belirtilmiştir [132]. Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, tip 2 diyabetli hastalarda yüksek plazma NAMPT seviyeleri görülmüş dolayısıyla NAMPT'nin T2DM patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmüştür [133]. Türk popülasyonunda gerçekleştirilen bir diğer çalışmada da tip 2 diyabetli hastalarda yüksek NAMPT seviyeleri gözlenmiştir [134]. Chang ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği meta-analiz çalışmasına göre diyabet ve obezitede yüksek plazma NAMPT değerlerinin bulunduğunu bu nedenle NAMPT ve diyabetin ilişkili olduğu ve NAMPT ile insülin direnci arasında anlamlı bir ilişki bulunduğunu anlaşılmıştır [135]. Yapılan bir diğer çalışmada yüksek NAMPT konsantrasyonunun adipositlerde kronik inflamasyon üretimini tetiklediği ve birçok dokuda insülin direncini indüklediği sonrasında ise pankreastaki beta hücrelerinin fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu belirtilmiştir [136].

NAMPT ve NAMPT'nin enzimatik ürünü olan NMN ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise her ikisinin de beta hücrelerinin canlılığı veya apoptozu üzerine doğrudan bir etkisinin bulunmadığı fakat glikoz ile uyarılan insülin sekresyonunu güçlendirdiği belirtilmiştir [45]. Yoshino ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, NMN'nin yüksek yağlı diyet ile indüklenen tip 2 diyabetli farelerde NAD biyosentezini teşvik ettiği ve glikoz intoleransını iyileştirdiği aynı zamanda hepatik insülin duyarlılığını da arttırdığı gözlenmiştir [53]. Çalışmada yaşlanma ile NAMPT ve NAD seviyelerinde azalma olduğu ve NMN'nin yaşa bağlı tip 2 diyabetli farelerde glikoz intoleransını ve lipid progillerini iyileştirdiği de gözlenmiştir [53]. Garten ve arkadaşlarının yaptığı derleme incelemesi, NAMPT'nin NAD biyosentezine bağlı olan enzimlerin aktivitesini etkilediği bu sayede hücre metabolizmasını düzenlediğini ve NAMPT ile ilgili yapılan birçok çalışmanın (*in vitro*) NMN'nin hücre fonksiyonu ve homeotazını, glikoz metabolizmasını ve stres tepkilerini iyileştirmede rol oynadığını gösterdiğini belirtmiştir [48]. Revollo ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, NAMPT aracılığı ile gerçekleşen NAD biyosentezinin beta hücrelerinin



fonksiyonu ve glikoz homeostazı için önemli bir role sahip olduğunu ve plazmada bulunan eNAMPT'nin dolaşımdaki NMN seviyelerini koruyarak beta hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde etkili olabileceğini bu sayede tip 2 diyabet için tedavi gelişimine katkıda bulunabileceğini belirtilmiştir [57].

IL-6 gibi sitokinlerin insülin direnci ve T2DM'nin gelişiminde bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir [71, 137-140]. Yapılan çalışmalara göre IL-6 düzeyinin tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar için markör olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [71, 137, 138]. Benzer şekilde, Pradhan ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile Garbers ve arkadaşlarının yaptığı çalışma tip 2 diyabetli hastaların IL-6 seviyelerinin kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğunu belirtmiştir [139, 140].

Adipositlerin ve adipoz doku makrofajlarının tip 2 diyabetteki plazma IL-6 düzeylerinin ana kaynağı olduğu bilinmektedir [70, 141]. Adipoz dokuda üretilen IL-6'nın, plazma IL-6 konsantrasyonlarını arttırmasıyla insülin direnci (hiperglisemi sonucu) ve dolayısıyla tip 2 diyabet gelişimine neden olduğunu belirten bazı çalışmalar bulunmaktadır [142, 143]. Adipoz dokunun IL-6 içeriğinin insülin direnciyle ilişkisi ile ilgili yapılan çalışmada; obezitedeki serum ile adipoz doku IL-6 seviyeleri arasında bir korelasyon olduğu ve açlık plazma glikoz oranlarının adipoz doku IL-6 içeriği ile ilişkisi olduğu dolayısıyla obezitede gözlenen insüline dirençli olma halinin adipoz hücreleri tarafından artan IL-6 üretimi ile alakalı olduğu belirlenmiştir [142]. Plazma IL-6 konsantrasyonlarının hiperlipidemi ve hiperglisemiye neden olarak insülin direncine yol açtığı ve tip 2 diyabet gelişiminin göstergesi olduğu belirtilmiştir [142-144].

Tip 2 diyabet ve IL-6 sinyal yolları ile ilgili yapılan birçok farklı çalışmada bulunmaktadır [70, 74, 78, 81, 145-147]. Akbari ve arkadaşlarının derlemesinde, gp130 aracılığı ile gerçekleşen IL-6 sinyalizasyonunun JAK/STAT, MAPK ve PI3K sinyal yollarının aktivasyonuna yol açtığı açıklanmıştır [70]. Ayrıca IL-6'nın adiposit, hepatosit ve iskelet kaslarındaki insülin sinyalizasyonunun düzenlenmesindeki işlevi detaylı şekilde incelenerek IL-6 üretimindeki ve sinyal yollarındaki bozuklukların tip 2 diyabet ve tip 2 diyabet ile ilişkili makrovasküler komplikasyonların gelişimindeki rolü belirtilmiştir [70]. Bir başka derlemede, karaciğer ve iskelet kaslarındaki IL-6 sinyalizasyonunun STAT3'e bağlı SOCS3 yukarı regülasyonuna yol açılması sonucunda insülin reseptörü subsratları 1/2'nin (IRS-1/2) insülin aracılı fosforilasyonunda ve protein kinaz B'nin (PBK/Akt) aktivasyonunda

bozukluklar meydana geldiği ifade edilmiştir [78]. Hunter ve Jones'un derlemesinde ise, IL6R'deki rs2228145 mutasyonunun dolaşımdaki sIL-6R seviyelerinde artışa yol açtığı ve bu durumun yüksek kardiyovasküler hastalık riski yaratan ve tip 2 diyabet, diyabetik nefropati, insülin direnci ve obezite duyarlılığını arttıran düşük C-reaktif protein seviyeleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [81]. MikroRNA üzerine yapılan bir çalışmada, JAK/STAT sinyal yolağının miR-22 tarafından regülasyonu ile tip 2 diyabette IL6R'nin pankreas  $\beta$  hücrelerinin canlılığının ve apoptozunun engellendiği gözlenmiştir [74]. Wang ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, NDRG2/IL-6/STAT3 sinyal yolağının aktivasyonu ile diyabetik retinopatinin oluşumu ve gelişimi pozitif olarak ilişkili bulunmuştur [145]. Yapılan bir diğer çalışmada, inflamatuvar Th17 hücrelerindeki MAP4K4 aşağı regülasyonunun proinflamatuvar sitokin olan IL-6'nın aşırı üretimine yol açtığı ve bu durumun insülin direncine sebep olduğu ve tip 2 diyabetin şiddetinin artması ile sonuçlanabileceği belirtilmiştir [147].

Vaspinin potansiyel olarak insülin duyarlılığını geliştirici etkileri olduğunu destekleyen birçok çalışma bulunmaktadır [91, 148]. Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, vaspinin adacık beta hücreleri için insülin duyarlaştırıcı ve antiinflamatuvar ajan olarak kullanabileceğini ve tip 2 diyabet tedavisinde ileriki çalışmalar için umut vadecici bir gelişme olduğunu belirtmiştir [91]. Yapılan diğer çalışmada, vaspinin obezite durumunda insülin duyarlaştırıcı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür [148]. Heiker ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmaya göre ise vaspin insülin duyarlılığını geliştirmek yerine insülinin yarı ömrünü arttırmaktadır [90].

Tip 2 diyabetli hastalardaki serum vaspin seviyelerine ilişkin çok sayıda çalışma yapılmıştır [98, 100, 102, 104, 105, 149-151]. Heiker'ın derlemesinde, vaspin serum konsantrasyonlarını etkileyen birçok SNP tanımlanmış olduğunu ve yüksek serum konsantrasyonlarının bozuk insülin duyarlılığı ve obezite ile ilişkili olduğunu belirtmiştir [98]. Tip 2 diyabetli hastalarda akut koroner sendromun patogeneğinde vaspinin rolünü belirlemek için gerçekleştirilen çalışmada, düşük serum vaspin seviyelerine sahip tip 2 diyabet hastalarında akut koroner sendrom için bir risk faktörü oluşturduğu görülmüştür [102]. Yapılan bir başka çalışmada, dolaşımdaki düşük vaspin ve adiponektin seviyelerinin tip 2 diyabetin gelişimi için risk faktörü oluşturduğunu ortaya koymuştur [104]. Tip 2 diyabetli kadın hastalar ile gerçekleştirilen klinik çalışmasında, serum vaspin seviyelerinin diyabetik kadınlarda insülin direnci ile ilişkili olduğu ve Hb1Ac ile pozitif korelasyon

gösterdiği görülmüş ayrıca mikrovasküler komplikasyonu olan hastaların serum vaspin seviyelerinin mikrovasküler komplikasyonu bulunmayan hastalara göre daha düşük olduğu belirlenmiştir [105]. Youn ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışma ise, yüksek serum vaspin konsantrasyonlarının obezite ve bozulmuş insülin duyarlılığı ile ilişkili olduğunu ve bu sayede biyomarkör olarak kullanılabileceğini göstermiştir [151].

Vaspin, IL-6 ve NAMPT ya da diğer adıyla Visfatin gibi çeşitli adipositokinlerin tip 2 diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalıklar ile olan ilişkilerini birlikte inceleyen farklı derleme ve klinik çalışmalar da bulunmaktadır [101, 103, 131, 152]. Yapılan birçok çalışma tip 2 diyabette, obezitede ve metabolik sendromlarda bazı adipokinlerin üretiminin etkilendiğini göstermiştir [131] ve bu hastalıklarda adipokinlerin önemli rol oynadığını düşündürmektedir [101]. Çalışmalar sitokinler ile insülin sinyal yolları arasında bir etkileşim olduğunu ve sitokinlerin varlığında insülin sinyalizasyonunun azaldığını göstermektedir [131].

Plazma NAMPT seviyelerinin yağ kütlesi ile pozitif bir ilişkisi olduğu tomografi taramalarıyla ölçülerek belirlenmiştir ancak deri altı yağ kütlesi ile zayıf bir ilişki gözlenmiştir [131]. Viseral NAMPT'nin mRNA ekspresyonunun da plazma konsantrasyonları ve vücut yağ kütlesinin yüzdesi ile pozitif olarak ilişkili olduğu ancak subkutan NAMPT ile negatif bir ilişkiye sahip olduğu bilinmektedir [103]. Dolaşımdaki NAMPT düzeyleri beyaz adipoz doku kütlesini yansıtmaktadır [101]. Ayrıca NAMPT kodlayan bir adenovirüs ile kronik olarak enfekte olmuş farelerde plazma visfatin seviyeleri iki kat artarken, glikoz ve insülin düzeyleri önemli derecede azaldığı görülmüştür [131]. İnsüline benzer şekilde, NAMPT'nin adipositler ve miyositlerde glikoz alınımlarını arttırdığı ve hepatositlerdeki glikoz salınımını inhibe ettiği [131] ayrıca adiposit farklılaşmasını arttırdığı sonucuna varılmıştır [101, 131]. NAMPT'nin monositlerde IL-6, TNF ve IL-1 $\beta$  sekresyonları ile kostimülatör moleküllerin ekspresyonunu uyardığı ve makrofajlarda da farklılaşma ve sitokin salgılanmasına (JNK ve NF $\kappa$ B'ye bağlı olarak) katkıda bulunduğu görülmüştür [101]. İnsülinin, insülin reseptörleri IRS-1 ve IRS-2'nin tirozin fosforilasyonunu ve fosfatidilinositol-3 kinaz, protein kinaz B ve MAP kinazın aktivasyonunu indüklediği bilindiği üzere NAMPT'nin insülin benzeri etkileri insülin transdüksiyon yolağında incelenmiştir [103, 131]. İnsülin ve NAMPT'nin insülin reseptörleri için aynı afiniteye sahip olduğu, NAMPT'nin insülin reseptörleri ile insülinin farklı bir bölgede fiziksel olarak etkileşime girdiği belirlenmiştir [103, 131, 152]. Ancak NAMPT'nin insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörüne bağlanamadığı da bilinmektedir

[103]. NAMPT'nin glikoz alımını arttırarak plazma glikoz konsantrasyonlarını azalttığı ayrıca GLUT4 reseptörlerinin hücre içi havuzdan plazma membranlarına translokasyonuna yardımcı olduğu belirlenmiştir [103]. Plazma NAMPT düzeyleri açlık durumunda insülin seviyelerinin %10'undan ve tokluk durumunda ise %3'ünden daha düşük bulunmuş dolayısıyla bu plazma konsantrasyon farklılıklarının NAMPT'nin glisemideki etkilerini açıklayabilir nitelikte olduğu düşünülmüştür [131]. Proinflamatuvar mediatör olan NAMPT'nin otoimmün hastalıklar ve adipoz doku inflamasyonunun neden olduğu insülin direnci gibi çeşitli inflamatuvar durumlarda rolü olduğu düşünülmektedir [101]. Enflamatuvar hastalıklara sahip kişilerde dolaşımda bulunan visfatin düzeylerinin yüksek olduğu [101], tip 2 diyabetli hastalarda progresif beta hücre bozuklukları ile serum NAMPT seviyelerinin arttığı [131] ve abdominal obezite ile tip 2 diyabete sahip olan insanlarda artan plazma NAMPT seviyeleri tespit edilmiştir [103]. Bunlara ek olarak, NAMPT'nin transkripsiyonu IL-6, TNF ve glukokortikoidler tarafından düzenlenmektedir [101]. NAMPT'nin aşağı regülasyonunda, kısmen p44/42 MAP kinaz tarafından kontrol edilen IL-6'nın çok hayati bir rolü bulunur [103]. 3T3-L1 adipositlerinde ise glukokortikoidler NAMPT sentezini uyarırken IL-6, TNF- $\alpha$ , büyüme hormonları ve beta-adrenerjik reseptör agonistlerinin NAMPT sentezini azalttığı düşünülmektedir [103].

IL-6 ile ilgili yapılan çalışmalar, akut inflamatuvar sürecin yokluğunda IL-6'nın %15-30'unun adipoz dokusundan üretildiğini göstermektedir [131]. Adipoz dokudaki IL-6 düzeyleri ile kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olan dolaşımdaki C-reaktif protein seviyeleri arasında pozitif bir ilişki olduğu bilinmektedir [131]. İnsülin direnci ve insülin direncinden doğan komplikasyonlar ile ilişkili olduğu düşünülen IL-6'nın plazma düzeylerinin kronik şekilde artması ve inflamatuvar durumlara bağlı olarak artan kardiyovasküler riskin insülin direncinin oluşmasına neden olabileceğini göstermektedir [131]. Yapılan bir çalışmada insüline dirençli yağ hücrelerine sahip bireylerde yaklaşık 15 kat yüksek IL-6 seviyeleri olduğu görülmüştür [103]. IL-6'nın insülin sinyalizasyonunda ve kas hücrelerinde dokulara özgü etkileri olduğu aynı zamanda bazı insülin duyarlaştırıcı özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [103]. IL-6, IRS'nin transkripsiyonunu azaltarak veya IRS ve Akt'nin fosforilasyonunu azaltarak adipositlerde ve karaciğerde insülin direncinin indüklenmesine sebep olmaktadır [103]. IL-6 kas hücrelerinde, miyotüplerin ve insülin ile uyarılan Akt fosforilasyon aktivitesinin glikoz alımını arttıran fosforilasyonu (protein kinaz C-delta yoluyla) indüklemektedir [103].

Vaspin üzerine yapılan çalışmalar, visceral adipoz dokuda çok güçlü bir şekilde eksprese edildiğini ve fare ile insan obezitesinde uyarıldığını göstermektedir [131]. Vaspin doku ekspresyon ve plazma seviyelerinin insülin veya insülin duyarlaştırıcı ilaçların varlığında normal düzeylere geldiği belirlenmiştir [131]. Yüksek yağlı diyetle bağlı obeziteye sahip farelerde ise enjekte edilen vaspin insülin direnci ve glikoz toleransında iyileşmelere sebep olmuştur [101, 131] aynı zamanda insülin direnci ile ilişkisi olan genlerin ekspresyonunda değişime sebep olduğu görülmüştür [101]. Vaspin'in adipoz doku tarafından indüksiyonu obeziteye karşı yanıt olarak telafi edici bir mekanizma oluşturduğu düşünülmektedir [101]. Farklı hayvan modelleri ile gerçekleştirilen vaspin ile tedavi çalışmalarında düşük glikoz seviyeleri ve düşük gıda alımı olduğu görülmüştür [101]. Obezite ve insülin direncine sahip olan farelerde serum vaspin seviyelerinin önemli ölçülerde arttığı gözlemlenmiştir [103]. Vaspinin gen ekspresyonunun yaş ve cinsiyet parametrelerinden etkilendiği ve farelerde insülin duyarlaştırıcıların aktivitesini arttırdığı bilinmektedir [103]. Vaspinin anti-inflamatuvar etkileri olan bir insülin duyarlaştırıcı olarak görev alabileceği varsayılmaktadır [103]. Rekominant obez farelerde vaspin ile tedavinin glikoz toleransını iyileştirdiği ve insülin duyarlılığının arttığı aynı zamanda besin alımının azaldığı görülmüştür [103].

El-Mesallamy ve arkadaşlarının Mısır popülasyonunda tip 2 diyabet hastaları ile gerçekleştirdiği klinik çalışmada, T2DM'nin patogenezinde vaspin ve NAMPT'nin birbirleri ile olan ilişkisini ve aynı zamanda bu iki adipositokinin IL-6 ile olan korelasyonunu incelemek amaçlanmıştır [152]. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tip 2 diyabet hastalarının vaspin ve NAMPT düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu ve NAMPT ile vaspinin çeşitli metabolik parametreler ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gözlenmiştir [152]. Çalışma NAMPT, vaspin ve IL-6 arasında bir tür etkileşim olduğu ve insülin direncine karşı telafi edici bir mekanizmanın varlığının netleşmesine yardımcı olabileceğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak NAMPT ve vaspinin T2DM patogenezinde önemli rol oynadığı ve NAMPT, vaspin ve IL-6'dan oluşan bu 3 adipositokinin birbirleri ile anlamlı bir biçimde ilişkili olduğu belirtilmiştir [152].

rs61330082 yapılan çalışmalara bakıldığında, tip 2 diyabetin makrovasküler komplikasyonlarından olan kardiyovasküler hastalıkların gelişim riskinin Çin popülasyonunda rs61330082 SNP'nin TT genotipi ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir [108]. Pankreas duktal adenokarsinomu için yapılan bir başka çalışmada, promotör bölgesinde bulunan rs61330082 SNP'nin NAMPT fonksiyonu ve ekspresyonu üzerinde etkisi olduğu

düşünülse de anlamlı bir ilişki bulunamamıştır [153]. Çin popülasyonunda dilate kardiyomiyopati hastaları ile gerçekleştirilmiş çalışmada ise, hasta grubu ve kontrol grubu arasında rs61330082 için genotip ve allel sıklığı bakımından önemli bir fark bulunmamıştır [154]. Koroner arter hastalığı ile NAMPT geninin rs61330082 SNP'i ile ilişkisinin belirlendiği bir başka çalışmada ise T allelinin koruyucu etki gösterirken, C allelinin koroner arter hastalığı için risk oluşturduğu düşünülmektedir [155]. Çin popülasyonundaki koroner arter kalsifikasyonu ve NAMPT geni polimorfizmleri ile ilgili yapılan çalışmada da rs61330082 SNP'indeki T allelinin koroner arter kalsifikasyonlu hastalar için koruyucu etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [156].

Chang ve diğerlerinin [108] çalışmasında rs61330082 ile birlikte incelenen rs2058539'un kardiyovasküler hastalarının total kolesterolünü etkileme potansiyeli (pozitif ilişki) olduğu düşünülmektedir. Yine rs61330082'in araştırıldığı koroner arter kalsifikasyonu ve NAMPT geni polimorfizmleri ile ilgili çalışmada rs2058539 SNP'i de incelenmiştir. rs2058539 SNP'i için gruplar arasında genotip ve allel sıklığı bakımından önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir ve rs2058539'un koroner arter kalsifikasyonu ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir [156]. Yapılan bir diğer çalışmada, NAMPT geni ve tip 2 diyabet ile glikoz ve lipid metabolizması arasındaki ilişki incelenmiş ve rs2058539 tek nükleotid polimorfizminin T2DM ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir [157].

rs2069860 ile yapılan çalışmalar bakıldığında, tip 2 diyabetteki böbrek fonksiyonu bozukluğu riski ile alakalı olduğu düşünülen *IL-6* geninin rs2069860 SNP'inin düşük minör allel sıklığına (MAF) sahip olduğu ve tek nükleotid polimorfizminin düşük olduğu belirtilmiştir [158]. Dvorynk ve diğerlerinin obezite gibi kompleks hastalıklar ile ilişkili SNP data çalışmasında da, rs2069860'ın 0,005 gibi düşük bir minör allel sıklığına sahip olduğu gösterilmiştir [159]. Alkolden bağımsız karaciğer yağlanması (NADFLD) ile ilgili yapılan bir çalışmada ise, rs2069860 (D162V) SNP'inin (gen temelli dominant) NADFLD için iyi huylu ve koruyucu özelliği olduğu belirtilmiştir [160].

Tip 2 diyabet ve *IL-6* genindeki polimorfizmler ile rs1554606 SNP'inin incelendiği farklı çalışmalar bulunmaktadır. Qi ve diğerlerinin çalışmasında [161], rs1554606 ve tip 2 diyabet riski arasında bir ilişki bulunmadığı (tek başına veya haplotipler halinde) belirtilmiştir. Afrika popülasyonunda gerçekleştirilmiş bir başka çalışmada, rs1554606 SNP'i tip 2 diyabet ve son evre böbrek hastalığı ile nominal olarak ilişkilendirilmiştir [162]. Tip 2 diyabet ve

rs1554606 ile ilgili başka bir çalışmada, doğuştan gelen bağışıklık yolu (metabolik ve fenotipik) ve rs1554606 arasında T2DM riski ilişkisi olduğu tespit edilmiştir [163]. Suudi popülasyonunda obezite ve metabolik değişimler ile ilgili yapılan çalışmada, rs1554606 genotipi ve allelik dağılımında (AA ile AG ve AA ile GG) erkek ve kadın grupları arasında önemli farklılıklar göstermiştir [164].

Japon popülasyonundaki insülin direnci ile ilgili çalışmada, rs77060950 SNP'nin (özellikle AA ve CA genotipleri) serum vaspin seviyeleri ile önemli bir ilişkisi olduğu belirtilmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülme de insülin direnci indeksinin AA genotipte daha yüksek olduğu ortaya konmuştur [149]. Yine Japon popülasyonunda gerçekleştirilmiş bir başka çalışmada, rs77060950 SNP'inin A alleleline (MAF) sahip kronik hemodiyaliz hastalarının yaklaşık %7'sinde anlamlı ölçüde yüksek serum vaspin seviyeleri görülmüştür [150]. *Vaspin* geninin intron polimorfizmlerinin tip 2 diyabetin patofizyolojisi üzerindeki etkisi ile ilgili yapılan bir çalışmada ise rs77060950 SNP'inin T2DM riski ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir [165].

Yine aynı çalışmada rs2236242 SNP'inin tip 2 diyabet ile önemli ölçüde ilişkili olduğu belirtilmiştir [165]. Yapılan bir başka çalışmada, Kafkas popülasyonunda rs2236242 SNP'inin minör allel sıklığı (A alleli) 0,377 bulunmuştur ve obeziteden bağımsız tip 2 diyabet ile olan pozitif ilişkisini göstermektedir [166]. Hosseini ve arkadaşlarının İran popülasyonunda gerçekleştirdiği çalışmada, rs2236242 SNP'inin A alleli ile tip 2 diyabet arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür [100].

Çalışmada PCR-RFLP sonucu elde ettiğimiz veriler ve Hardy-Weinberg denkliği ile yapılan analizde (Çizelge 4.19) *NAMPT* geninin rs2058539 SNP'i 0,002 ve *IL-6* geninin rs2069860 SNP'i 0,020 *p* değerleri ile anlamlı sonuç göstermektedir ( $p < 0,05$ ).

LightSNiP Assay ile gerçekleştirilen Real-Time PCR sonuçlarının analizine (Çizelge 4.22) göre ise 0,043 *p* değeri ile rs1554606 SNP'i (*IL-6*) anlamlı bir sonuç göstermektedir ( $p < 0,05$ ).

Spesifik olarak belirlenmiş özel SNP bölgelerine uygun olarak tasarlanan LightSNiP Assay ile gerçekleştirilmiş Real-Time PCR verilerinin kesinlik açısından PCR-RFLP sonuçlarına göre daha güvenilir olduğu söylenebilir. PCR-RFLP yönteminde enzim kesim bölgeleri ve

inkübasyon süreleri elde edilen sonucu etkilemektedir. Bazı PCR-RFLP sonuçlarının kısmı kesim nedeniyle yanlış yorumlanmış olma ihtimali bulunmaktadır. Ayrıca rs2069860 SNP'i için tasarlanan primer çifti nedeniyle PCR ürün bandı (537 bp) ve kesim bandı (466 bp) jel görüntüsünde birbirine çok yakın şekilde konumlanmıştır. Bu da yine kesim sonucunun yanlış yorumlanmış olması durumunu ortaya çıkarmaktadır. Daha düzgün bir RFLP çalışması için farklı primer çiftleri tasarlanabilir ve XbaI enzimi ile yapılan kesimin inkübasyon süresi daha belirgin sonuçlar elde etmek amacı ile arttırılabilir.





## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, Türk popülasyonunda *NAMPT*, *IL-6* ve *Vaspin* genleri ile tip 2 diyabet hastalığı arasındaki olası ilişkileri belirlemek üzere rs61330082, rs2058539, rs2069860, rs1554606, rs77060950 ve rs2236242 SNP'leri ile gerçekleştirilen gen polimorfizmi çalışmamızda *IL-6* geni ve rs1554606 SNP'i ( $p < 0,05$ ) ile tip 2 diyabet arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür.

*NAMPT*, *IL-6* ve *Vaspin* genlerinin ve gen polimorfizmlerinin tip 2 diyabet ve tip 2 diyabetin komplikasyonlarıyla ilişkisi ile ilgili yapılacak ileriki çalışmalar gereklidir. Bu tür çalışmalar gen polimorfizmlerin hastalık üzerindeki etkisini aynı zamanda farklı polimorfizmlerin olası etkileşimlerini anlayabilmek için açısından önemlidir.



## KAYNAKLAR

1. International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas*. (Tenth edition). Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.
2. Holt, R. I. G. and Hanley, N. A. (2021). *Essential Endocrinology and Diabetes*. (Seventh edition). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
3. Holt, R. I. G., Cockram, C. S., Flyvbjerg, A., and Goldstein, B. J. (2016). *Textbook of Diabetes*. (Fifth edition). Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
4. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022, August 12). NAMPT nicotinamide phosphoribosyltransferase [ Homo sapiens (human) ]. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10135>, Son Erişim Tarihi: 19.08.2022.
5. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022, August 14). IL6 interleukin 6 [ Homo sapiens (human) ]. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569>, Son Erişim Tarihi: 24.08.2022.
6. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022, August 7). SERPINA12 serpin family A member 12 [ Homo sapiens (human) ]. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/145264>, Son Erişim Tarihi: 24.08.2022.
7. Bandeira, F., Gharib, H. Griz, L. and Faria, M. (Editors). (2022). *Endocrinology and Diabetes : A Problem Oriented Approach*. (Second edition). Cham, Switzerland: Springer International Publishing, Imprint, Springer.
8. International Diabetes Federation. (2019). *IDF Diabetes Atlas*. (Ninth edition). Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.
9. Rees, A., Levy, M. and Lansdown, A. (2017). *Clinical Endocrinology and Diabetes at a Glance*. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc.
10. Natinaol Diabetes Data Group. (1979). Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 28(12), 1039-1057.
11. World Health Organization. (1980). WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus: Second Report. *World Health Organization Technical Report Series*, 646, 1-80.
12. World Health Organization. (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *WHO*. Geneva, 4-16.
13. Kuzuya, T. and Matsuda, A. (1997). Classification of diabetes on the basis of etiologies versus degree of insulin deficiency. *Diabetes Care*, 20(2), 219-220.
14. DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Zimmet, P. and Alberti G. (2015). *International textbook of diabetes mellitus*. (Fourth edition). Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc.

15. World Health Organization. (2019). Classification of diabetes mellitus. *WHO*. Geneva, 4-28.
16. American Diabetes Association. (2021). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care*, 44 (Suppl 1), S15-S33.
17. World Health Organization. (2016). Global report on diabetes. *WHO*. Geneva, 11-80.
18. Rodriguez-Saldana, J. (Editor). (2019). *The Diabetes Textbook : Clinical Principles, Patient Management and Public Health Issues*. (First edition). Cham: Springer International Publishing, Imprint, Springer.
19. Lin, X., Xu, Y., Pan, X., Xu, J., Ding, Y., Sun, X., Song, X., Ren, Y., and Shan, P. F. (2020). Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. *Scientific Reports*, 10(1), 14790.
20. İnternet: International Diabetes Federation. (2021). Diabetes Data Portal. Web: <https://diabetesatlas.org/data/en/>, Son Erişim Tarihi: 26.07.2022.
21. İnternet: World Health Organization. (2020). Leading causes of death and disability 2000-2019: A visual summary. Web: <https://www.who.int/data/stories/leading-causes-of-death-and-disability-2000-2019-a-visual-summary>, Son Erişim Tarihi: 25.07.2022.
22. İnternet: World Health Organization. (2019). The top 10 causes of death. Web: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, Son Erişim Tarihi: 25.07.2022.
23. İnternet: World Health Organization. (2020). Global health estimates: Leading causes of death. Cause-specific mortality, 2000–2019. Top 10 causes of death in Turkey for both sexes aged all ages. Web: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>, Son Erişim Tarihi: 25.07.2022.
24. İnternet: International Diabetes Federation. (2021). Turkey Diabetes Report 2000-2045. Web: <http://diabetesatlas.org/data/en/country/203/tr.html>, Son Erişim Tarihi: 24.07.2022.
25. World Health Organization. (2020). Diagnosis and management of type 2 diabetes (HEARTS-D). *WHO*. Geneva, 9-35.
26. Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H. and Martín, C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6275.
27. Taylor, R. (2013). Type 2 diabetes: etiology and reversibility. *Diabetes Care*, 36(4), 1047-1055.
28. Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y., and Zhang, W. (2014). Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *International Journal of Medical Sciences*, 11(11), 1185-1200.

29. Faselis, C., Katsimardou, A., Imprialos, K., Deligkaris, P., Kallistratos, M. and Dimitriadis, K. (2020). Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Vascular Pharmacology*, 18(2), 117–124.
30. Owen, K., Turner, H., and Wass, J. (2022). *Oxford handbook of Endocrinology and Diabetes*. (Fourth edition). 198 Madison Avenue, New York, NY 10016, USA: Oxford University Press.
31. Viigimaa, M., Sachinidis, A., Toumpourleka, M., Koutsampasopoulos, K. Alliksoo, S. and Titma, T. (2020). Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Vascular Pharmacology*, 18(2), 110–116.
32. Fowler, M. J. (2011). Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*, 26(2), 77–82.
33. Tonyan, Z. N., Nasykhova, Y. A., Danilova, M. M. and Glotov, A. S. (2021). Genetics of macrovascular complications in type 2 diabetes. *World Journal of Diabetes*, 12(8), 1200-1219.
34. Lyssenko, V., Groop, L. and Prasad, R. B. (2015). Genetics of Type 2 Diabetes: It Matters From Which Parent We Inherit the Risk. *The Review of Diabetic Studies*, 12(3-4), 233-242.
35. Ali, O. (2013). Genetics of type 2 diabetes. *World Journal of Diabetes*, 4(4), 114-123.
36. Ahlqvist, E., Ahluwalia, T. S. and Groop, L. (2011). Genetics of type 2 diabetes. *Clinical Chemistry*, 57(2), 241-254.
37. Meigs, J. B. (2019). The Genetic Epidemiology of Type 2 Diabetes: Opportunities for Health Translation. *Current Diabetes Reports*, 19(8), 62.
38. Pavan, S., Delvento, C., Ricciardi, L., Lotti, C., Ciani, E. and D'Agostino, N. (2020). Recommendations for Choosing the Genotyping Method and Best Practices for Quality Control in Crop Genome-Wide Association Studies. *Frontiers in Genetics*, 11, 447.
39. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022). Genome Data Viewer Homo sapiens NAMPT gene. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?id=10135>, Son Erişim Tarihi: 19.06.2022.
40. İnternet: Ensembl. (2022, July). Homo sapiens Gene NAMPT. Web: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?g=ENSG00000105835;r=7:106248298-106285966;time=1656240426990.99](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?g=ENSG00000105835;r=7:106248298-106285966;time=1656240426990.99), Son Erişim Tarihi: 10.07.2022.
41. İnternet: GeneCards The Human Gene Database. (2022). NAMPT Gene - Nicotinamide Phosphoribosyltransferase. Web: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NAMPT>, Son Erişim Tarihi: 19.06.2022.

42. Garten, A., Petzold, S., Körner, A., Imai, S. and Kiess, W. (2009). Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(3), 130-138.
43. Tanaka, T. and Nabeshima, Y. (2007). Nampt/PBEF/Visfatin: a new player in beta cell physiology and in metabolic diseases?. *Cell Metabolism*, 6(5), 341-343.
44. Dakroub, A., Nasser, S. A., Younis, N., Bhagani, H., Al-Dhaheri, Y., Pintus, G., Eid, A. A., El-Yazbi, A. F. and Eid, A. H. (2020). Visfatin: A Possible Role in Cardiovascular Metabolic Disorders. *Cells*, 9(11), 2444.
45. Spinnler, R., Gorski, T., Stolz, K., Schuster, S., Garten, A. Beck-Sickinger, A. G., Engelson, M. A., de Koning, E. J., Körner, A., Kiess, W. and Maedler, K. (2013). The adipocytokine Nampt and its product NMN have no effect on beta-cell survival but potentiate glucose stimulated insulin secretion. *PLoS One*, 8(1), e54106.
46. Stastny, J., Bienertova-Vasku, J. and Vasku, A. (2012). Visfatin and its role in obesity development. *Diabetes and Metabolic Syndrome*, 6(2), 120-124.
47. Grolla, A. A., Travelli, C., Genazzani, A. A. and Sethi, J. K. (2016). Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase, a new cancer metabokine. *British Journal of Pharmacology*, 173(14), 2182-2194.
48. Garten, A., Schuster, S., Penke, M., Gorski, T., de Giorgis, T. and Kiess, W. (2015). Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(9), 535-546.
49. Recinella, L., Orlando, G., Ferrante, C., Chiavaroli, A., Brunetti, L. and Leone, S. (2020). Adipokines: New Potential Therapeutic Target for Obesity and Metabolic, Rheumatic, and Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Physiology*, 11, 578966.
50. Navas, L. E. and Carnero, A. (2021). NAD(+) metabolism, stemness, the immune response, and cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 2.
51. Gardell, S. J., Hopf, M., Khan, A., Dispagna, M., Hampton Sessions, E., Falter, R., Kapoor, N., Brooks, J., Culver, J., Petucci, C., Ma, C. T., Cohen, S. E., Tanaka, J., Burgos, E. S., Hirschi, J. S., Smith, S. R., Sergienko, E. and Pinkerton, A. B. (2019). Boosting NAD(+) with a small molecule that activates NAMPT. *Nature Communications*, 10(1), 3241.
52. Khaidizar, F. D., Bessho, Y. and Nakahata, Y. (2021). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase as a Key Molecule of the Aging/Senescence Process. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3709.
53. Yoshino, J., Mills, K. F., Yoon, M. J. and Imai, S. (2011). Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metabolism*, 14(4), 528-536.
54. Yoshino, J., Baur, J. A. and Imai, S. I. (2018). NAD(+) Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. *Cell Metabolism*, 27(3), 513-528.

55. Grolla, A. A., Miggianno, R., Di Marino, D., Bianchi, M., Gori, A., Orsomando, G., Gaudino, F., Galli, U., Del Grosso, E., Mazzola, F., Angeletti, C., Guarneri, M., Torretta, S., Calabro, M., Boumya, S., Fan, X., Colombo, G., Travelli, C., Rocchio, F., Aronica, E., Wohlschlegel, J. A., Deaglio, S., Rizzi, M., Genazzani, A. A. and Garavaglia, S. (2020). A nicotinamide phosphoribosyltransferase-GAPDH interaction sustains the stress-induced NMN/NAD(+) salvage pathway in the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 295(11), 3635-3651.
56. Nacarelli, T., Lau, L., Fukumoto, T., Zundell, J., Fatkhutdinov, N., Wu, S., Aird, K. M., Iwasaki, O., Kossenkova, A. V., Schultz, D., Noma, K. I., Baur, J. A., Schug, Z., Tang, H. Y., Speicher, D. W., David, G. and Zhang, R. (2019). NAD(+) metabolism governs the proinflammatory senescence-associated secretome. *Nature Cell Biology*, 21(3), 397-407.
57. Revollo, J. R., Körner, A., Mills, K. F., Satoh, A., Wang, T., Garten, A., Dasgupta, B., Sasaki, Y., Wolberger, C., Townsend, R. R., Milbrandt, J., Kiess, W. and Imai, S. (2007). Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme *Cell Metabolism*, 6(5), 363-375.
58. Kover, K., Tong, P. Y., Watkins, D., Clements, M., Stehno-Bittel, L., Novikova, L., Bittel, D., Kibiryeva, N., Stuhlsatz, J., Yan, Y., Ye, S. Q. and Moore, W. V. (2013). Expression and regulation of nampt in human islets. *PLoS One*, 8(3), e58767.
59. Houtkooper, R. H., Cantó, C., Wanders, R. J. and Auwers, J. (2010). The secret life of NAD<sup>+</sup>: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrine Reviews*, 31(2), 194-223.
60. Yoon, J., Lee, K. J., Oh, G. S., Kim, G. H. and Kim, S. W. (2017). Regulation of Nampt expression by transcriptional coactivator NCOA6 in pancreatic beta-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 487(3), 600-606.
61. Yu, A., Zhou, R., Xia, B., Dang, W., Yang, Z. and Chen, X. (2020). NAMPT maintains mitochondria content via NRF2-PPARalpha/AMPKalpha pathway to promote cell survival under oxidative stress. *Cellular Signalling*, 66, 109496.
62. Sayers, S. R., Beavil, R. L., Fine, N., Huang, G. C., Choudhary, P., Pacholarz, K. J., Barran, P. E., Butterworth, S., Mills, C. E., Cruickshank, J. K., Silvestre, M. P., Poppitt, S. D., McGill, A. T., Lavery, G. G., Hodson, D. J. and Caton, P. W. (2020). Structure-functional changes in eNAMPT at high concentrations mediate mouse and human beta cell dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 63(2), 313-323.
63. Imai, S. and Kiess, W. (2009). Therapeutic potential of SIRT1 and NAMPT-mediated NAD biosynthesis in type 2 diabetes. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)*, 14(8), 2983-2995.
64. Imai, S. I. (2016). The NAD World 2.0: the importance of the inter-tissue communication mediated by NAMPT/NAD(+)/SIRT1 in mammalian aging and longevity control. *NPJ Systems Biology and Applications*, 2, 16018.



65. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022). Genome Data Viewer Homo sapiens IL6 gene. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?id=3569>, Son Erişim Tarihi: 21.06.2022.
66. İnternet: Ensembl. (2022, July). Homo sapiens Gene IL6. Web: [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?g=ENSG00000136244;r=7:2725884-22732002](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?g=ENSG00000136244;r=7:2725884-22732002), Son Erişim Tarihi: 10.07.2022.
67. İnternet: GeneCards The Human Gene Database. (2022). IL6 Gene - Interleukin 6. Web: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL6>, Son Erişim Tarihi: 21.06.2022.
68. Choy, E. H., De Benedetti, F., Takeuchi, T., Hashizume, M., John, M. R. and Kishimoto, T. (2020). Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nature Reviews Rheumatology*, 16(6), 335-345.
69. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G. and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal*, 374(Pt 1), 1-20.
70. Akbari, M. and Hassan-Zadeh, V. (2018). IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes. *Inflammopharmacology*, 26(3), 685-698.
71. Qu, D., Liu, J., Lau, C. W. and Huang, Y. (2014). IL-6 in diabetes and cardiovascular complications. *British Journal of Pharmacology*, 171(15), 3595-3603.
72. Ridker, P. M. and Rane, M. (2021). Interleukin-6 Signaling and Anti-Interleukin-6 Therapeutics in Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 128(11), 1728-1746.
73. Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), a016295.
74. Wu, X., Yu, T., Ji, N., Huang, Y., Gao, L., Shi, W., Yan, Y., Li, H., Ma, L., Wu, K. and Wu, Z. (2019). IL6R inhibits viability and apoptosis of pancreatic beta-cells in type 2 diabetes mellitus via regulation by miR-22 of the JAK/STAT signaling pathway. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity : Targets and Therapy*, 12, 1645-1657.
75. Patsalos, O., Dalton, B. and Himmerich, H. (2020). Effects of IL-6 Signaling Pathway Inhibition on Weight and BMI: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6290.
76. Skuratovskaia, D., Komar, A., Vulf, M., Quang, H. V., Shunkin, E., Volkova, L., Gazatova, N., Zatolokin, P. and Litvinova, L. (2021). IL-6 Reduces Mitochondrial Replication, and IL-6 Receptors Reduce Chronic Inflammation in NAFLD and Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1774.
77. Kang, S., Narazaki, M., Metwally, H. and Kishimoto, T. (2020). Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *Journal of Experimental Medicine*, 217(5), e20190347.

78. Schmidt-Arras, D. and Rose-John, S. (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *Journal of Hepatology*, 64(6), 1403-1415.
79. Rajendran, S., Anquetil, F., Quesada-Masachs, E., Graef, M., Gonzalez, N., McArdle, S., Chu, T., Krogvold, L., Dahl-Jørgensen, K., and von Herrath, M. (2020). IL-6 is present in beta and alpha cells in human pancreatic islets: Expression is reduced in subjects with type 1 diabetes. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 211, 108320.
80. Uciechowski, P. and Dempke, W. (2020). Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology*, 98(3), 131-137.
81. Hunter, C. A. and Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, 16(5), 448-457.
82. Ayelign, B., Negash, M., Andualem, H., Wondemagegn, T., Kassa, E., Shibabaw, T., Akalu, Y. and Molla, M. D. (2021). Association of IL-10 (- 1082 A/G) and IL-6 (- 174 G/C) gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus in Ethiopia population. *BMC Endocrine Disorders*, 21(1), 70.
83. Aparicio-Siegmund, S., Garbers, Y., Flynn, C. M., Waetzig, G. H., Gouni-Berthold, I., Krone, W., Berthold, H. K., Laudes, M., Rose-John, S. and Garbers, C. (2019). The IL-6-neutralizing sIL-6R-sgp130 buffer system is disturbed in patients with type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 317(2), E411-E420.
84. Giraldez, M. D., Carneros, D., Garbers, C., Rose-John, S. and Bustos, M. (2021). New insights into IL-6 family cytokines in metabolism, hepatology and gastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(11), 787-803.
85. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022). Genome Data Viewer Homo sapiens Vaspın gene. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?id=145264>, Son Erişim Tarihi: 21.06.2022.
86. İnternet: Ensembl. (2022, July). Homo sapiens Gene SERPINA12. Web: [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?g=ENSG00000165953;r=14:94487274-94517844](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?g=ENSG00000165953;r=14:94487274-94517844), Son Erişim Tarihi: 10.07.2022.
87. İnternet: GeneCards The Human Gene Database. (2022). SERPINA12 Gene - Serpin Family A Member 12. Web: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SERPINA12>, Son Erişim Tarihi: 21.06.2022.
88. Kurowska, P., Mlyczynska, E., Dawid, M., Jurek, M., Klimczyk, D., Dupont, J. and Rak, A. (2021). Review: Vaspın (SERPINA12) Expression and Function in Endocrine Cells. *Cells*, 10(7), 1710.
89. Sun, N., Wang, H. and Wang, L. (2015). Vaspın alleviates dysfunction of endothelial progenitor cells induced by high glucose via PI3K/Akt/eNOS pathway. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(1), 482-489.

90. Heiker, J. T., Klötting, N., Kovacs, P., Kuettner, E. B., Sträter, N., Schultz, S., Kern, M., Stumvoll, M., Blüher, M. and Beck-Sickinger, A. G. (2013). Vaspin inhibits kallikrein 7 by serpin mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(14), 2569-2583.
91. Liu, S., Li, X., Wu, Y., Duan, R., Zhang, J., Du, F., Zhang, Q., Li, Y. and Li, N. (2017). Effects of vaspin on pancreatic beta cell secretion via PI3K/Akt and NF-kappaB signaling pathways. *PLoS One*, 12(12), e0189722.
92. Liu, S., Duan, R., Wu, Y., Du, F., Zhang, J., Li, X., Guo, S., Wang, M., Zhang, Q., Li, Y. and Li, N. (2018). Effects of Vaspin on Insulin Resistance in Rats and Underlying Mechanisms. *Scientific Reports*, 8(1), 13542.
93. Jung, C. H., Lee, W. J., Hwang, J. Y., Seol, S. M., Kim, Y. M., Lee, Y. L. and Park, J. Y. (2011). Vaspin protects vascular endothelial cells against free fatty acid-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(2), 264-269.
94. Li, H., Peng, W., Zhuang, J., Lu, Y., Jian, W., Wei, Y., Li, W. and Xu, Y. (2013). Vaspin attenuates high glucose-induced vascular smooth muscle cells proliferation and chemokinesis by inhibiting the MAPK, PI3K/Akt, and NF-kappaB signaling pathways. *Atherosclerosis*, 228(1), 61-68.
95. Akbarzadeh, S., Nabipour, I., Jafari, S. M., Movahed, A., Motamed, N., Assadi, M. and Hajian, N. (2012). Serum visfatin and vaspin levels in normoglycemic first-degree relatives of Iranian patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 95(1), 132-138.
96. Blüher, M. (2012). Vaspin in obesity and diabetes: pathophysiological and clinical significance. *Endocrine*, 41(2), 176-182.
97. Li, J., Li, Q., Zhu, Y. C., Wang, Y. K., Gao, C. P., Li, X. Y., Ji, T. and Bai, S. J. (2019). Association of vaspin rs2236242 gene variants with type 2 diabetes and obesity in a Chinese population: A prospective, single-center study. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), 16097-16101.
98. Heiker, J. T. (2014). Vaspin (serpinA12) in obesity, insulin resistance, and inflammation. *Journal of Peptide Science: an official publication of the European Peptide Society*, 20(5), 299-306.
99. Shaker, O. G. and Sadik, N. A. (2013). Vaspin gene in rat adipose tissue: relation to obesity-induced insulin resistance. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 373(1-2), 229-239.
100. Hosseini, M., Nezhadali, M. and Hedayati, M. (2021). Association of vaspin rs2236242 gene polymorphism with serum vaspin level, insulin resistance and diabetes in an Iranian diabetic/pre-diabetic population. *Journal of Medical Biochemistry*, 40(1), 33-40.

101. Andrade-Oliveira, V., Câmara, N. O. and Moraes-Vieira, P. M. (2015). Adipokines as drug targets in diabetes and underlying disturbances. *Journal of diabetes research*, 2015, 681612.
102. Sathyaseelan, A. J., Adole, P. S., Wyawahare, M. and Saya, R. P. (2016). Assessment of Serum VASPIN Levels among Type 2 Diabetes Mellitus Patients with or without Acute Coronary Syndrome. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(12), BC07-BC10.
103. Jaganathan, R., Ravindran, R. and Dhanasekaran, S. (2018). Emerging Role of Adipocytokines in Type 2 Diabetes as Mediators of Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. *Canadian Journal of Diabetes*, 42(4), 446-456 e1.
104. Jian, W., Peng, W., Xiao, S., Li, H., Jin, J., Qin, L., Dong, Y. and Su, Q. (2014). Role of serum vaspin in progression of type 2 diabetes: a 2-year cohort study. *PLoS One*, 9(4), e94763.
105. Gulcelik, N. E., Karakaya, J., Gedik, A., Usman, A. and Gurlek A. (2009). Serum vaspin levels in type 2 diabetic women in relation to microvascular complications. *European Journal of Endocrinology*, 160(1), 65-70.
106. Klöting, N., Berndt, J., Kralisch, S., Kovacs, P., Fasshauer, M., Schön, M. R., Stumvoll, M. and Blüher, M. (2006). Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(1), 430-436.
107. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2021, April 9). rs61330082                      Reference                      SNP                      Report.                      Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs61330082>, Son Erişim Tarihi: 24.06.2022.
108. Chang, M. L., Lin, Y. S., Chang, M. Y., Hsu, C. L., Chien, R. N. and Fann, C. S. (2021). Accelerated cardiovascular risk after viral clearance in hepatitis C patients with the NAMPT-rs61330082 TT genotype: An 8-year prospective cohort study. *Virulence*, 12(1), 270-280.
109. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2021, April 9). rs2058539                      Reference                      SNP                      Report.                      Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2058539>, Son Erişim Tarihi: 24.06.2022.
110. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2021, April 9). rs2069860                      Reference                      SNP                      Report.                      Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2069860>, Son Erişim Tarihi: 24.06.2022.
111. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2021, April 9). rs1554606                      Reference                      SNP                      Report.                      Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1554606>, Son Erişim Tarihi: 24.06.2022.
112. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2021, April 9). rs77060950                      Reference                      SNP                      Report.                      Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs77060950>, Son Erişim Tarihi: 24.06.2022.

113. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2021, April 9). rs2236242 Reference SNP Report. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2236242>, Son Erişim Tarihi: 24.06.2022.
114. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2017, November 9). Polymerase Chain Reaction (PCR). Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>, Son Erişim Tarihi: 14.07.2022.
115. Garibyan, L. and Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1-4.
116. Alberts, B. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. (Sixth edition). New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group, 473-477.
117. Wilson, K., Walker, J. M., Hofmann, A. and Clokie, S. (2018). *Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. (Eighth edition). Cambridge, United Kingdom; New York, NY, USA: Cambridge University Press, 110-115.
118. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.vA., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Martin, K. C., Yaffe, M. B. and Amon, A. (2021). *Molecular Cell Biology*. (Ninth edition). New York: Macmillan Learning, 241-245.
119. Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M. and Stahl, D. A. (2021). *Brock Biology of Microorganisms*. (Sixteenth edition). Hoboken, NJ: Pearson Education, 369-372.
120. Carson, S., Miller, H. B., Srougi, M. and Witherow, D. S. (2019). *Molecular Biology Techniques : A Classroom Laboratory Manual*. (Fourth edition). London, United Kingdom; Waltham, MA: Elsevier/Academic Press, 23-25.
121. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2021, May 13). Polymerase Chain Reaction. Encyclopedia Britannica. Web: <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>.
122. İnternet: National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2017, November 9). Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>, Son Erişim Tarihi: 14.07.2022.
123. Brown, T.A. (2016). *Gene cloning and DNA analysis : an introduction*. (Seventh edition). Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd, 164-284.
124. Biassoni, R. and Raso, A. (Editors). (2020). *Quantitative Real-Time PCR : Methods and Protocols*. (Second edition). Methods in Molecular Biology 2065. New York, NY: Springer New York : Imprint: Humana.
125. Luthra, R., Singh, R. R. and Patel, K. P. (Editors). (2016). *Clinical applications of PCR*. (Third edition). Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press.

126. Dondu, A., Caliskan, M. and Orenay-Boyacioglu, S. (2022). Link between obsessive-compulsive disorder and polymorphisms in HDAC genes. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 44(2), 156-163.
127. Cheli, S., Pietrantonio, F., Clementi, E. and Falvella, F. S. (2015). LightSNiP assay is a good strategy for pharmacogenetics test. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 114.
128. Roche Applied Science. (2008). LightCycler Real-Time PCR Systems Application Manual. Roche. Mannheim, 14-21.
129. Cao, H. (2014). Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *Journal of Endocrinology*, 220(2), T47-T59.
130. Nakamura, K., Fuster, J. J. and Walsh, K. (2014). Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *Journal of Cardiology*, 63(4), 250-259.
131. Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S. and Bastard, J. P. (2008). Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes and Metabolism*, 34(1), 2-11.
132. López-Bermejo, A., Chico-Julià, B., Fernàndez-Balsells, M., Recasens, M., Esteve, E., Casamitjana, R., Ricart, W. and Fernàndez-Real, J. M. (2006). Serum visfatin increases with progressive beta-cell deterioration. *Diabetes*, 55(10), 2871-2875.
133. Chen, M. P., Chung, F. M., Chang, D. M., Tsai, J. C., Huang, H. F., Shin, S. J. and Lee, Y. J. (2006). Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(1), 295-299.
134. Dogru, T., Sonmez, A., Tasci, I., Bozoglu, E., Yilmaz, M. I., Genc, H., Erdem, G., Gok, M., Bingol, N., Kilic, S., Ozgurtas, T. and Bingol, S. (2007). Plasma visfatin levels in patients with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 76(1), 24-29.
135. Chang, Y. H., Chang, D. M., Lin, K. C., Shin, S. J. and Lee, Y. J. (2011). Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 27(6), 515-527.
136. Kumari, B. and Yadav, U. (2018). Adipokine Visfatin's Role in Pathogenesis of Diabesity and Related Metabolic Derangements. *Current Molecular Medicine*, 18(2), 116-125.
137. Lowe, G. D. (2005). Circulating inflammatory markers and risks of cardiovascular and non-cardiovascular disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), 1618-1627.

138. Spranger, J., Kroke, A., Möhlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., Boeing, H. and Pfeiffer, A. F. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, 52(3), 812-817.
139. Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E. and Ridker, P. M. (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, 286(3), 327-334.
140. Garbers, C., Heink, S., Korn, T. and Rose-John, S. (2018). Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(6), 395-412.
141. Makki, K., Froguel, P. and Wolowczuk, I. (2013). Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflammation*, 2013, 139239.
142. Bastard, J. P., Maachi, M., Van Nhieu, J. T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J. J., Capeau, J. and Hainque, B. (2002). Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(5), 2084-2089.
143. Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A. and Bhatt, A. N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(9), 11553-11572.
144. Donath, M. Y. and Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 98-107.
145. Wang, Y., Zhai, W. L. and Yang, Y. W. (2020). Association between NDRG2/IL-6/STAT3 signaling pathway and diabetic retinopathy in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(7), 3476-3484.
146. Liu, Y. T., He, T., Li, H. Q. and Jiang, P. (2021). Liraglutide improves pancreatic islet  $\beta$  cell apoptosis in rats with type 2 diabetes mellitus by inhibiting the IKK $\epsilon$ /NF- $\kappa$ B pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25(14), 4818-4828.
147. Chuang, H. C. and Tan, T. H. (2017). MAP4K4 and IL-6(+) Th17 cells play important roles in non-obese type 2 diabetes. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 4.
148. Hida, K., Wada, J., Eguchi, J., Zhang, H., Baba, M., Seida, A., Hashimoto, I., Okada, T., Yasuhara, A., Nakatsuka, A., Shikata, K., Hourai, S., Futami, J., Watanabe, E., Matsuki, Y., Hiramatsu, R., Akagi, S., Makino, H. and Kanwar, Y. S. (2005). Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10610-10615.

149. Teshigawara, S., Wada, J., Hida, K., Nakatsuka, A., Eguchi, J., Murakami, K., Kanzaki, M., Inoue, K., Terami, T., Katayama, A., Iseda, I., Matsushita, Y., Miyatake, N., McDonald, J. F., Hotta, K. and Makino, H. (2012). Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance, and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(7), E1202-E1207.
150. Inoue, J., Wada, J., Teshigawara, S., Hida, K., Nakatsuka, A., Takatori, Y., Takatori, Y., Kojo, S., Akagi, S., Nakao, K., Miyatake, N., McDonald, J. F. and Makino, H. (2012). The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrology*, 13, 163.
151. Youn, B. S., Klöting, N., Kratzsch, J., Lee, N., Park, J. W., Song, E. S., Ruschke, K., Oberbach, A., Fasshauer, M., Stumvoll, M. and Blüher, M. (2008). Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, 57(2), 372-377.
152. El-Mesallamy, H. O., Kassem, D. H., El-Demerdash, E. and Amin, A. I. (2011). Vaspin and visfatin/Nampt are interesting interrelated adipokines playing a role in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 60(1), 63-70.
153. Li, B., Zhang, C., Wang, J., Zhang, M., Liu, C. and Chen, Z. (2020). Impact of genetic variants of ABCB1, APOB, CAV1, and NAMPT on susceptibility to pancreatic ductal adenocarcinoma in Chinese patients. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 8(6), e1226.
154. Dou, Q., Peng, Y., Zhou, B., Zhang, K., Lin, J., Dai, X., Zhang, L. and Rao, L. (2015). Association of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Gene Polymorphisms and of Serum NAMPT Levels with Dilated Cardiomyopathy in a Chinese Population. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 22299-318.
155. Wang, L. S., Yan, J. J., Tang, N. P., Zhu, J., Wang, Y. S., Wang, Q. M., Tang, J. J., Wang, M. W., Jia, E. Z., Yang, Z. J. and Huang, J. (2011). A polymorphism in the visfatin gene promoter is related to decreased plasma levels of inflammatory markers in patients with coronary artery disease. *Molecular Biology Reports*, 38(2), 819-825.
156. Jin, L. W., Zheng, S. B., Zhou, Z. H., Pan, S. F. and Zheng, Y. (2016). Correlation between polymorphisms in the visfatin gene and its expression in the serum and coronary artery calcification. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), gmr8217.
157. Jian, W. X., Luo, T. H., Gu, Y. Y., Zhang, H. L., Zheng, S., Dai, M., Han, J. F., Zhao, Y., Li, G. and Luo, M. (2006). The visfatin gene is associated with glucose and lipid metabolism in a Chinese population. *Diabetic Medicine: a journal of the British Diabetic Association*, 23(9), 967-973.
158. Ng, D.P., Nurbaya, S., Ye, S. H. and Krolewski, A. S. (2008). An IL-6 haplotype on human chromosome 7p21 confers risk for impaired renal function in type 2 diabetic patients. *Kidney International*, 74(4), 521-527.



159. Dvornyk, V., Long, J. R., Xiong, D. H., Liu, P. Y., Zhao, L. J., Shen, H., Zhang, Y. Y., Liu, Y. J., Rocha-Sanchez, S., Xiao, P., Recker, R. R. and Deng, H. W. (2004). Current limitations of SNP data from the public domain for studies of complex disorders: a test for ten candidate genes for obesity and osteoporosis. *BMC Genetics*, 5, 4.
160. Kleinstein, S. E., Rein, M., Abdelmalek, M. F., Guy, C. D., Goldstein, D. B., Mae Diehl, A. and Moylan, C. A. (2018). Whole-Exome Sequencing Study of Extreme Phenotypes of NAFLD. *Hepatology Communications*, 2(9), 1021-1029.
161. Qi, L., van Dam, R. M., Meigs, J. B., Manson, J. E., Hunter, D. and Hu, F. B. (2006). Genetic variation in IL6 gene and type 2 diabetes: tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. *Human Molecular Genetics*, 15(11), 1914-1920.
162. Leak, T. S., Langefeld, C. D., Keene, K. L., Gallagher, C. J., Lu, L., Mychaleckyj, J. C., Rich, S. S., Freedman, B. I., Bowden, D. W. and Sale, M. M. (2010). Chromosome 7p linkage and association study for diabetes related traits and type 2 diabetes in an African-American population enriched for nephropathy. *BMC Medical Genetics*, 11, 22.
163. Arora, P., Garcia-Bailo, B., Dastani, Z., Brenner, D., Villegas, A., Malik, S., Spector, T. D., Richards, B., El-Sohemy, A., Karmali, M. and Badawi, A. (2011). Genetic polymorphisms of innate immunity-related inflammatory pathways and their association with factors related to type 2 diabetes. *BMC Medical Genetics*, 12, 95.
164. Alharbi, K. K., Syed, R. and Khan, I. A. (2014). Association of interleukin-6 polymorphisms with obesity and metabolic alterations in young Saudi population. *Molecular Biology Reports*, 41(3), 1519-1523.
165. Rathwa, N., Parmar, N., Palit, S. P., Patel, R., Ramachandran, A.V. and Begum, R. (2020). Intron specific polymorphic site of vaspin gene along with vaspin circulatory levels can influence pathophysiology of type 2 diabetes. *Life Sciences*, 243, 117285.
166. Kempf, K., Rose, B., Illig, T., Rathmann, W., Strassburger, K., Thorand, B., Meisinger, C., Wichmann, H. E., Herder, C. and Vollmert, C. (2010). Vaspin (SERPINA12) genotypes and risk of type 2 diabetes: Results from the MONICA/KORA studies. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 118(3), 184-189.



*GAZİ GELECEKTİR..*