

NLRP3 İnflamazom Geni rs4925648, rs121908149 ve rs121908152 Varyantları ile Tip 2 Diyabet Riski

The rs4925648, rs121908149 and rs121908152 Genetic Variations in the NLRP3 Inflammasome and Risk of Type 2 Diabetes

¹Cansu Özbayer, ²Medine Nur Kebapçı, ³Emine Yağcı, ³Hülyam Kurt, ³Hasan Veysi Güneş, ⁴İrfan Değirmenci

¹Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Kütahya, Türkiye
²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Endokrinoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye
³Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye
⁴Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya, Türkiye

Özet: Tip 2 diyabet (T2DM), insülinin tamamen veya kısmi eksikliğine bağlı olarak gelişen ve hiperglisemi ve insülin direnci ile karakterize bir hastalıktır. İnflamasyon, zararlı, yabancı veya yıkıcı etkilere karşı organizmanın doğal savunma yanıtıdır. Son çalışmalar, inflamasyon, insülin direnci ve tip 2 diyabetin patogenezi arasındaki bağlantıyı vurgulamıştır. İnflamazom, inflamasyon üretme potansiyeli olan uyarıcıları tanıyan ve buna yanıt olarak proinflatuar sitokinlerin üretimi ve salgılanmasından sorumlu bir süreci yöneten protein kompleksidir. Farklı tipte inflamazom yapıları bulunmakla birlikte tip 2 diyabet, insülin direnci ve obezite ile ilişkisi rapor edilen inflamazom NLRP3 (Nod-like receptor pyrin domain-containing 3) inflamazomdur. Makrofajlarda, NLRP3 inflamasyonu aktive eder ve insülin sinyalini bozar, ve bu hem TNF-bağımlı hem de TNF bağımsız yollar vasıtası ile insülinin hedefi olan hücrelerde insülin direncine neden olur. Çalışmamızın amacı NLRP3 geninin rs4925648, rs121908149 ve rs121908152 varyantlarının ilişkisini araştırmaktır. Bu amaçla 100 T2DM hastası ve 100 kontrol bireye ait DNA'lar NLRP3 geni rs4925648, rs121908149, rs121908152 varyantları için Sequenom MassARRAY® sistemi ve İplex GOLD SNP protokolü kullanarak genotiplendirildi ve sonrasında uygun istatistik yöntemler ile değerlendirildi. Çalışmamız sonucunda rs4925648 (p=0.0108), rs121908149, rs121908152 varyantlarına ait genotip frekansları ile T2DM riski arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. rs4925648 bölgesi için hasta ve kontrol bireylerde polimorfik genotip olan TT genotipine sahip olan birey bulunmazken, bireylerin CC ve CT genotip dağılımlarının benzer düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte rs4925648 varyasyonu için heterozigot ve dominant modeller istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0.048). rs121908149 bölgesi için tüm bireyler, atasal genotip olan CC genotipine sahip olarak belirlenmiştir. rs121908152 bölgesinde de tüm bireyler atasal TT genotip olarak sekanslanmıştır. Bu iki varyantın genotipik çeşitlilik göstermesi bu bölgenin korunmuş bir bölge olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Sonuç olarak, inflamazom yapısında yer alan NLRP3 genine ait rs121908149 ve rs121908152 varyantları Türk toplumunda T2DM riski ile ilişkili bulunmamasıyla birlikte rs4925648 varyantı tip 2 diyabetle ilişkili bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: inflamasyon, inflamazom, nlrp3, tip 2 diyabet, genetik varyant

Özbayer C, Kebapçı MU, Yağcı E, Kurt H, Güneş HV, Değirmenci İ. 2019, NLRP3 İnflamazom Geni rs4925648, rs121908149 ve rs121908152 Varyantları ile Tip 2 Diyabet Riski, *Osmangazi Tıp Dergisi*, 41(2): 153-160, **Doi:** 10.20515/otd.460753

Abstract: Type 2 diabetes (T2DM) is a disease characterized by a complete or partial deficiency of insulin, hyperglycaemia and insulin resistance. Inflammation is the natural defensive response of the organism against any harmful, foreign or destructive effect. Recent studies have emphasized the link between inflammation, insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes. Inflammasome is a protein complex that recognizes stimulants with the potential to produce inflammation and, in response, processes a process responsible for the production and secretion of proinflammatory cytokines. There are different types of inflammatory structures, but NLRP3 (Nod-like receptor pyrin domain-containing-3) inflammasome has been associated with type 2 diabetes, insulin resistance and obesity. In macrophages, NLRP3 activates inflammation and impairs insulin signaling, causes insulin resistance by TNF-dependent and TNF-independent pathways in cells targeted to insulin. The aim of our study is to investigate the relationship of rs4925648, rs121908149 and rs121908152 variants of the NLRP3 gene. For this purpose, DNA samples isolated from blood samples of 100 T2DM patients and 100 control individuals were genotyped using the Sequenom MassARRAY system and the Iplex GOLD SNP protocol for the NLRP3 rs10925027 and rs4925659 variants and then evaluated with appropriate statistical methods. As a result of our study genotype frequencies of rs4925648 (p=0.108), rs121908149, rs121908152 variants between the risk of T2DM was not statistically significant difference. While there was no individuals with TT genotype which were polymorphic genotypes in the patient and control subjects for rs4925648 site, it was found that CC and CT genotype distributions were similar. But in heterozygous and dominant model rs4925648 site show statistically significant distribution (p=0.048). The all individuals have CC genotype which is ancestral genotype in the rs121908149. Also in the rs121908152 region, all individuals were sequenced as ancestral TT genotype. The genotypic variation of these variants can be interpreted as this region can be a protected region. In conclusion, rs121908149 and rs121908152 variants from the NLRP3 gene in the structure of the inflammasome could not be associated with T2DM risk in patients with Turkish origin while rs4925648 variant was found to be associated with type 2 diabetes.

Key Words: inflammation, inflammasome, nlrp3, type 2 diabetes, rs4925648, rs121908149, rs121908152

Ozbayer C, Kebapçı MU, Yagci E, Kurt H, Gunes HV, Degirmenci I. 2019, The rs4925648, rs121908149 and rs121908152 Genetic Variations in the NLRP3 Inflammasome and Risk of Type 2 Diabetes, *Osmangazi Journal of Medicine*, 41(2): 153-160, **Doi:** 10.20515/otd.460753

ORCID ID of the authors: C.O. 0000-0002-1120-1874; M.N.K. 0000-0002-8286-5256; E.Y. 0000-0003-2179-1318; H.K. 0000-0003-2433-9925; H.V.G. 0000-0002-0932-906X; İ.D. 0000-0001-7666-0230

1. Giriş

Tip 2 diyabet, insülinin tamamen veya kısmi eksikliğine bağlı olarak gelişen ve yüksek kan şekeri (hiperglisemi) ile karakterize bir hastalıktır. İnsülin eksikliğinin yanı sıra insüline karşı gelişen direnç, hastalık gelişiminde rol oynamakta ve karbohidrat, lipid ve protein metabolizmasını da etkilemektedir [1]. İnsülin direnci sendromu; santral obezite, hipertansiyon, dislipidemi, hiperinsülinemi içeren ve büyük damarlarda hastalık gelişme riskini artıran bir metabolik anormallik grubu ile birlikte bulunur ve tip 2 diyabetin birincil karakteristik özelliğidir [2]. Tip 2 diyabet için aday olan hastalarda, β -hücrelerinin kompanse etme yeteneği azalır ve bozulmuş glukoz toleransı ve sonunda tip 2 diyabete neden olan göreceli insülin yetmezliği gelişir. Yani vücut, ürettiği insüline yanıt veremez ya da kullanamaz [3-5].

İnflamasyon, immünolojik veya immünolojik olmayan her türlü zararlı, yabancı ve yıkıcı etkene karşı organizmanın verdiği doğal savunma yanıtıdır [6]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda inflamasyon ve insülin direnci arasındaki ilişkiye vurgu yapılmakta olup, tip 2 diyabet ve obezite patogeneğinde aktive olmuş inflamatuvar cevabın önemli yere sahip olduğu, pro-inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin β hücre ölümüne ve kronik hiperglisemiye neden olduğu belirtilmektedir [7, 8].

İnflamazom, inflamasyon üretme potansiyeli olan uyarıcıları tanıyan ve buna yanıt olarak proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ve salgılanmasından sorumlu süreci yöneten bir protein kompleksidir [9]. Farklı tipte inflamazom yapıları bulunmakla birlikte tip 2 diyabet, insülin direnci ve obezite ile ilişkisi rapor edilen inflamazom, NLRP3 (Nod-like receptor pyrin domain-containing 3) inflamazomdur [10].

NLRP3 inflamazom kompleksi temel olarak bir sinyal algılayıcı alt birimden, kaspaz-1 enziminden ve bu ikisini birbirine bağlayan Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD (ASC) adlı proteinlerden oluşur (CARD: Caspase Activation and

Recruitment Domain). ASC'nin bileşenleri pyrin (PYR) ve CARD'dır. NLRP3-inflamazomun sinyal algılayıcı alt birimi NLRP3 'tür [11].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda da NLRP3 inflamazomunun, tip 2 diyabet ve insülin direnci mekanizmalarında önemli rolü olduğu vurgulanmaktadır. Yapılan çalışmalar gen ekspresyonu ve protein analizlerini kapsamakla birlikte [12-15] henüz literatürde NLRP3 inflamazom ile ilişkili genetik varyasyonlar ve tip 2 diyabet riski arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Genetik polimorfizmler toplumda bulunma frekansı yüksek, bir gen veya DNA dizisindeki değişikliklerdir. DNA dizisindeki bu değişiklikleri mutasyondan ayıran özellik, en az 100 kişiden 1'inde bulunmasıdır. Genetik polimorfizmlerin en yaygın türü tek baz çifti varyasyonu içeren tek nükleotid polimorfizmleridir [16]. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) genomda tek bir nükleotidin (A, T, C veya G) bir başkasıyla yer değiştirdiğinde oluşan DNA dizi değişimleridir [17]. Bazı gen polimorfizmleri bir hastalık riskini artırırken bazıları azaltabilmekte (koruyucu alel), bazı polimorfik aleller ise yalnızca çevresel bir faktörün etkisi altındayken riski etkileyebilmektedir [18].

Verilen bilgiler doğrultusunda çalışmamızın amacı, tip 2 diyabet ve insülin direnci patogeneğinde önemli rol oynayan inflamasyon mekanizmasının ana bileşenlerinden biri olan NLRP3 inflamazom ilişkili rs4925648, rs121908149 ve rs121908152 varyantının tip 2 diyabet ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

2. Materyal ve Metod

Çalışmamız için gerekli olan Etik Kurulu onayı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 28-04-2016 yılı 107 karar numarası ile verilmiştir. Araştırmamızda analizi gerçekleştirilecek genetik polimorfizmler için gerekli malzemelerin sağlanabilmesi amacıyla

çalışma proje önerisi haline getirilmiş ve Dumlupınar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu 28-04-2016 tarihinde 2016-34 proje numarası ile proje önerimizi destekleme kararı almıştır.

Çalışmamızda tip 2 diyabet ve insülin direnci patogenezinde önemli rol oynayan inflamasyon mekanizmasının ana bileşenlerinden biri olan NLRP3 genine ait rs4925648, rs121908149 ve rs121908152 gen varyantının tip 2 diyabet ile ilişkisi araştırılmıştır.

Örnek seçimi ve saflık tayini

ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Gen Bankasında saklanan 100 tip 2 diyabet hastası ile 100 kontrol bireye ait DNA örneklerinin miktarı ve saflık derecesi NanoDrop (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer uDrop, Thermo Scientific™) ile ölçüldü.

Genotipleme

Çalışmamızda araştırmayı hedeflediğimiz ilgili genlerdeki varyasyonların genotipleri, Sequenom MassARRAY® System (Sequenom Inc., San Diego, California, ABD) kullanılarak analiz edildi. MassARRAY Analyzer ise özellikle genomik uygulamalar için dizayn edilmiş, masa üstü tam otomatik bir MALDI-TOF (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) kütle spektrometresidir [19].

Sequenom MassARRAY® sistemi, somatik mutasyon profillemeye, genotipleme, metilasyon analizi ve kantitatif gen ekspresyonu gibi çeşitli uygulamaların yapılmasına imkan tanımaktadır [19]. Biz bu platformda İplex GOLD SNP genotiplemesini yürüttük.

- *İplex GOLD SNP genotipleme protokolü*
- *Primer dizaynı ve primer karışımı hazırlanması*

Amplifikasyon ve uzama primerlerinin dizaynı Sequenom Assay Designer 3.1 yazılımında yapıldı ve amplifikasyon koşulları belirlendi. Primerlerin MALDI-TOF kütle spektrometresinin tespit aralığı dışında kalması gerektiğinden kütlelerini arttırmak için amplifikasyon primerlerinin 5' uçlarına bir 10-mer tag dizisi (5'-ACGTTGGATG-3') bulunmaktadır. Varyasyon bölgelerinin amplifikasyonu için dizayn edilen ve üretici firmadan temin edilecek olan primer çiftleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Primerler dimer oluşturmayacak şekilde tek kuyucukta (well) reaksiyona girebilecek şekilde dizayn edilmiştir. Varyasyon bölgelerinin amplifikasyonundan sonra İplex GOLD reaksiyonu ile varyasyonun tespit edilmesine yardımcı olan uzama primerlerinin de dizaynı yapılmış olup sekans ve özellikleri Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo1.

DNA amplifikasyonu için dizayn edilen oligonükleotid primer çiftleri

| SNP ID | Primer amplifikasyon primer dizisi | Sekonder amplifikasyon primer dizisi | AMP_LEN |
|-------------|------------------------------------|--------------------------------------|---------|
| rs121908149 | ACGTTGGATGAGAAACCCAGGATCTCCACA | ACGTTGGATGTCTGCTCATCACCACGAGAC | 106 |
| rs4925648 | ACGTTGGATGCTATGAGGTGCACCTATTCC | ACGTTGGATGGTTCCTTCCTGGTTCTAAAC | 120 |
| rs121908152 | ACGTTGGATGTGGTTTACCAGGCCAAAGAG | ACGTTGGATGTCCTTCTGGAAAACCTATGGC | 99 |

AMP_LEN: Amplikon uzunluğu

Tablo 2.

Primer uzama reaksiyonu için dizayn edilen oligonükleotid primerler

| SNP ID | Ekstansiyon primer dizisi | Tm(NN) | PcGC |
|-------------|---------------------------|--------|------|
| rs121908149 | CCACGAGACCTGTGG | 48.6 | 66.7 |
| rs4925648 | TGGTTCTAAACCCCTCGG | 51.6 | 55.6 |
| rs121908152 | TCGAAAAGGGGTATTTGATTT | 48.3 | 33.3 |

Tm(NN): Nearest Neighbor metodu ile hesaplanmış ekstansiyon primer erime sıcaklığı

PcGC: Ekstansiyon primerlerin GC içeriği yüzdesi

Amplifikasyon primerleri üretici firmadan (Metabion, Martinsried, Germany) temin edildi ve konsantrasyonu 0.5 µM, final hacminin ise distile su ile tamamlanarak 200 µl olacak şekilde hesaplaması yapıldı ve PCR amplifikasyonu için hazır duruma getirildi.

- *DNA miktarının optimizasyonu ve pipetlenmesi*

Her bir İplex GOLD reaksiyonu için 5-10 ng/µL aralığında DNA miktarı gerekmektedir. Bu nedenle, DNA konsantrasyonu 10 ng/µL olacak şekilde stok solüsyonundan elüsyon solüsyonu ile sulandırma yapıldı.

DNA örnekleri 384 kuyucuklu PCR plakasında önceden planlanan şekilde 1'er µl olacak şekilde pipetlendi.

- *Multipleks DNA Amplifikasyonu*

Multipleks DNA amplifikasyonu için PCR karışımı her bir kuyucukta DNA miktarı ile birlikte toplam 5 µl olacak şekilde planlandı. Örnek miktarı ve negatif kontrol kuyucuğu düşünülerek toplam karışım hacmi hesaplandı ve Multiplex her bir örnek için toplam 5.0 µl PCR karışımı hazırlandı.

+4°C'de saklanan PCR plakası üzerindeki optik yapışkan PCR film çıkartılarak hazır duruma getirildi. Mikrosantrifüj tüplerine hazırlanan PCR karışımları ise vortekslenip hafif şekilde santrifüj edildi. Daha sonra, PCR karışımı elektronik pipetleme seti (Eppendorf Repeater® Xstream Electronic Pipette, Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) yardımıyla önceden DNA pipetlenmiş kuyucuklara 4'er µl dağıtıldı.

Pipetleme işlemi tamamlandıktan sonra PCR plakası yeniden optik yapışkan film ile kapatılarak vortekslenildi. Sonrasında, 2000 rpm'de çok kısa bir süre santrifüj edilerek Bio-Rad C1000™ Thermal Cycler (California, USA) cihazına yerleştirildi ve amplifikasyon protokolü yürütüldü.

- *SAP (Shrimp Alkalen Fosfataz) reaksiyonu*

SAP reaksiyonu için reaktifler kuyucuk miktarı kadar 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne eklenerek karışım hazırlandı. Daha sonra, termal cycler cihazından çıkarılan PCR plakasının reaksiyon yürütülen bütün kuyucuklarına 2'şer µl SAP karışımından dağıtıldı. SAP karışımı, reaksiyon yürütülen bütün kuyucuklara pipetlendikten sonra PCR plakası optik yapışkan film ile kapatılarak vortekslenildi. Sonrasında, plaka 2000 rpm'de çok kısa bir süre santrifüj edilerek termal cycler cihazına yerleştirildi. SAP şartları üretici talimatlarına uygun protokol ile yürütüldü.

- *Primer uzama reaksiyonu (İplexGOLD reaksiyonu)*

Primer uzama reaksiyonu veya İplexGOLD reaksiyonu olarak ifade edilen bu PCR aşaması için önceden primer karışımı hazırlanmıştı. Bu nedenle, reaktiflerin bulunduğu ve primer karışımının kullanıldığı her bir kuyucuk için toplamda 2 µl olan PCR karışımı hazırlandı.

Kuyucuk miktarına göre hesaplanan ve mikrosantrifüj tüplerine hazırlanan PCR karışımı vortekslenip hafif şekilde santrifüj

edildi. Daha sonra, elektronik pipetleme seti yardımıyla PCR plakası üzerindeki her bir örnek ve negatif kontrol için ayrılan kuyucuklara 2'şer µl dağıtıldı.

Pipetleme işlemi tamamlandıktan sonra PCR plakası yeniden optik yapışkan film ile kapatılarak vortekslendi. Sonrasında, 2000 rpm'de çok kısa bir süre santrifüj edilerek termal cycler cihazına yerleştirildi. PCR şartları İplex GOLD Reaksiyonu için ayarlanarak reaksiyon başlatıldı.

- *Rezin ile temizlik aşaması*

İplexGOLD reaksiyonu sonrasında termal cycler cihazından çıkartılan PCR plakasını rezin ile muamele edebilmek için ilk önce optik yapışkan film kaldırıldı. Daha sonra, rezinin daha iyi çözünüp istenilen sonucu verebilmesi adına reaksiyon yürütülen her bir kuyucuğa 16'şar µl ultra saflaştırılmış su eklendi. Su dağıtıldıktan sonra PCR plakasının üzeri yapışkan film ile kapatılarak kısa bir süre 2000 rpm'de santrifüj edildi. PCR plakasındaki 384 kuyucuk için toz halinde, steril 6 mg rezin yeterlidir. Bu miktar baz alınarak transfer plakaya steril rezin eklendi, steril cam palet yardımıyla transfer plakaya yayıldı. Transfer plaka 384 kuyucuklu örnek plate'ine kapatıldı ve sert bir darbe ile rezinin transfer plakadan örnek kuyucuklarına dağıtılması sağlandı. Rezin dağıtımı sonrası PCR plakamız yeniden farklı bir yapışkan film ile kapatıldı. Sonrasında, PCR plaka döndürücü ile 35 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu yapıldı.

- *SpectroCHIP üzerine PCR ürünlerinin aktarılması*

Rezin ile temizlik aşamasından sonra PCR plakasının kuyucuklarında bulunan reaksiyon ürünlerini SpectroCHIP üzerine aktarma işlemine geçildi. Bunun için nano boyutunda pipetleme yapabilen MassARRAY™ Nanodispenser RS1000 cihazı kullanıldı.

İlk önce cihazın gerekli bölmelerine distile su, % 98.9'luk etil alkol, % 50'lik etil alkol ve 3-point kalibrant eklenerek sistemin hazırlığı yapıldı. Daha sonra, PCR plakamız ve SpectroCHIP cihaz içerisinde kendileri için ayrılan yerlerine oturtuldu. Nanodispenser

RS1000 cihazının kendisine ait ekranından PCR plakamızın 384 kuyucuklu olduğu, kuyucuklarda hangi varyasyonların analiz edileceği ve plakadan pipetlenecek miktarın ne kadar olması gerektiği programlandı. SpectroCHIP üzerine aktarma işlemini başlatmadan cihazın kendini temizleme programı aktif hale getirildi. Cihaz pipetleme yapacağı iğnelerini yıkayarak hazır duruma geldi.

Cihaza başlama komutu verilerek üzerinde matriks spotlar bulunan SpectroCHIP'deki kuyucuklara her bir PCR ürününden yaklaşık olarak 12 nl pipetleme yapması sağlandı. Böylelikle, PCR ürünlerimiz yaklaşık olarak 10 cm X 10 cm boyutundaki SpectroCHIP üzerine yerleştirilmiş oldu.

- *Kütle Spektrometre Analizi*

SpectroCHIP üzerine aktarılan PCR ürünlerimizi kütlelerine göre analiz etmek için MALDI-TOF kütle spektrometre tekniğini kullanan MassARRAY analizörü kullanıldı. Güç kaynağı düğmesi açılarak çalıştırılan analizörün çip koyulması için dizayn edilen bölmesine kendi örneklerimizi taşıyan SpectroCHIP yerleştirildi. Daha sonra bölme kapatılarak bilgisayar üzerindeki analizörün programından SpectroCHIP üzerindeki kuyucukların koordinatları girildi. Gerekli bilgiler girildikten sonra analiz işlemi başlatıldı. Böylelikle, analizör teker teker bütün kuyucukların matrikslerini lazer ile patlatarak içindeki PCR ürünlerinin kütlelerini analiz etmeye başladı. Kısa bir süre sonunda kütlelerine göre yaptığı analiz ile genotip sonuçlarının tamamını bilgisayar ekranında raporladı.

İstatistiksel Analiz

Gruplar arası genotip dağılımları IBM SPSS Statistics 21 yazılımı kullanılarak ki-kare analizi (Pearson ve tam ki-kare testleri) ile değerlendirildi. Genotip dağılımları anlamlı çıkan varyantlar için allel frekansları ve Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) değerleri FINNETI programı (<https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) ile belirlendi. Tüm analizlerde 0.05'den küçük p-değerleri anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

Araştırmamız kapsamında hasta ve kontrol bireylerde belirlemiş olduğumuz NLRP3 gen varyantlarına ait genotip frekansları ve istatistik değerlendirmeleri Tablo 3’de sunulmuştur.

Araştırdığımız gen varyantlarından rs121908149 ve rs121908152’ye ait genotip dağılımları tüm bireyler için sırasıyla atasal genotipler olan CC ve TT olarak belirlenmiş olup bu nedenle rs121908149 ve rs121908152 varyantları istatistik değerlendirmeye dahil edilmemiştir.

Tablo 3.
NLRP3 geni varyantlarına ait genotip frekansları ve istatistik değerlendirmeleri

| SNP | rs4925648 | | | P | rs121908149 | | rs121908152 | |
|--------------|------------|-----------|----|-------|-------------|-------|-------------|-------|
| Grup | CC | CT | TT | | CC | CT/TT | TT | TC/CC |
| Kontrol | 76 | 24 | - | | 100 | - | 100 | - |
| T2DM | 85 | 15 | - | 0.108 | 100 | - | 100 | - |
| Total | 161 | 39 | - | | 200 | - | 200 | - |

rs121908149 ve rs121908152 varyantları için saasal genotip dağılımı nedeni ile istatistiksel analiz uygulanmamıştır.

Çalışmamızda yer alan rs4925648 varyantına ait genotip frekansları incelendiğinde hasta ve kontrol bireylerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p>0.05, Tablo 3).

Bununla birlikte heterozigot ve dominant modelde genotip dağılımlarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.048, Tablo 4).

Tablo 4.
NLRP3 geni rs4925648 varyantına ait allel frekansları ve genotip değerlendirmeleri

| Grup | Alel | | P | OR (95 % CI) | Genotip | | | P | HWE |
|-----------------------------------|-------------------------|----|-------------------------|----------------------------|-------------------------|----|--------------------------|-------|-------|
| | C | T | | | CC | CT | TT | | |
| Kontrol | 179 | 24 | | 0.538 (0.277- 1.044) | 76 | 24 | - | | 0.043 |
| T2DM | 185 | 15 | 0.063 | | 85 | 15 | - | 0.108 | 0.269 |
| OR (95 % CI) (Risk alel C) | | | | | | | | | |
| Heterozigot CC vs CT | Homozigot CC vs TT | | Dominant CC vs CT+TT | | Resesif CC+CT vs TT | | Armitage’s trend test | | |
| 0.497 (0.246-1.003) | 1.118 (0.022-57.013) | | 0.497 (0.246-1.003) | | 0.971 (0.019-49.408) | | Common OR: 1.791 | | |
| p=0.048 | p=1.000 | | p=0.048 | | p=1.000 | | p=0.048 | | |

OR: Odds ratio, CI: Confidence interval, HWE: Hardy-Weinberg equilibrium

4. Tartışma

Çalışmamız kapsamında tip 2 diyabet ve insülin direnci patogeneğinde önemli rol oynayan inflamasyon mekanizmasının ana bileşenlerinden biri olan NLRP3 genine ait 3 gen varyantının tip 2 diyabet ve insülin direnci ile ilişkisi araştırılmış olup bu bölümde bulgularımız tartışılacaktır. Literatürde, araştırmamız kapsamındaki varyantların birçoğu ve tip 2 diyabet patogenezi için veriye rastlanmamış olup bu varyantlar ilişkilendirildikleri diğer patolojilere ait veriler ile tartışılacaktır.

NLRP3 geni rs4925648 varyantı ile ilgili literatürde sınırlı sayıda veri bulunmakla birlikte T2DM ve NLRP3 geni rs4925648 varyantının araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bununla birlikte NLRP3 geni, Çin Han popülasyonunda ülseratif kolit (UC) ve Crohn hastalığı (CD) riski için araştırılmış, NLRP3 gen varyantları ile CD arasında bir ilişki bulunmamıştır. NLRP3 geni rs4925648 varyantı UC ile de ilişkili bulunmamış ancak haplotip analiz sonuçları rs4925648-rs10925019 varyantları CC ve TT genotipleri için UC hastalık riski faktörü olarak tanımlanmıştır [20].

Yapılan bir başka çalışmada, inflamazom genlerinde yer alan polimorfizmler ve Çin popülasyonundaki kömür işçilerinin pnömokonyozu (CWP) riski açısından değerlendirilmiş ve NLRP3 rs4925648 polimorfizmi CWP ile ilişkili bulunmamıştır [21].

Çalışmamızda da, NLRP3 rs4925648 varyantı ile ilgili veriler değerlendirildiğinde; hasta ve kontrol bireylerde polimorfik genotip olan TT genotipine sahip olan birey bulunmazken, bireylerin CC ve CT genotip dağılımları benzer düzeydeydi. Genotip ve alel

dağılımlarında istatistiksel anlam belirlenmedi ancak heterozigot ve dominant model değerlendirmesi CC genotipinin hastalık riski ile ilişkili olabileceğini gösterdi.

Yapılan literatür değerlendirmesi sonucunda NLRP3 geni rs121908149 varyantının herhangi bir patoloji ile ilgili olarak araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu bölümde NLRP3 geni rs121908149 varyantı bulgularımız dahilinde yorumlanacaktır. İlginç bir şekilde çalışmamızda da NLRP3 geni rs121908149 bölgesi için tüm bireyler, atasal genotip olan CC genotipine sahip olarak belirlenmiştir. rs121908149 varyantının genotipik çeşitlilik göstermesi bu bölgenin korunmuş bir bölge olabileceği şekilde yorumlanabilir.

Araştırmamız kapsamında değerlendirdiğimiz bir diğer varyant olan NLRP3 geni rs121908152 varyantının herhangi bir patoloji ile ilgili olarak araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu bölümde NLRP3 geni rs121908152 varyantı bulgularımız dahilinde yorumlanacaktır. rs121908149 varyantına yakın olan bu bölgede, rs121908149 varyantında olduğu gibi tüm bireyler için atasal TT genotipi olarak sekanslanmıştır. Benzer şekilde rs121908152 varyantının da genotipik çeşitlilik göstermesi bu bölgenin korunmuş bir bölge olabileceği şekilde yorumlanabilir.

5. Sonuç

İnflamazom yapısında yer alan NLRP3 genine ait varyantlardan rs121908149 ve rs121908152 Türk toplumunda T2DM riski ile ilişkili olmamakla birlikte rs4925648 varyantının hastalık için riske sahip olabileceği ancak daha büyük popülasyonlar da araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Halifeođlu İ, Karataş F, Çolak R, Canatan H, Selda T. Tip 2 diyabetik hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası oksidan ve antioksidan durum. *Fırat Tıp Dergisi*. 2005;10:117-22.
2. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz fundamentals of clinical chemistry*. 2001.
3. Katz MJ, Ness SM. *Diabetes Mellitus, Type 2*. 2014.
4. Özbayer C, Kurt H, Yangı B. TLR4 Sinyal Yolağındaki Genetik Varyantların İnsülin Direnci ve Diyabet Riski İle İlişkisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*. 2014;5:168-72.
5. Ginter E, Simko V: Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century. In: *Diabetes*. edn.: Springer; 2013: 42-50.
6. Kumar V, Abbas AK, Aster JC: *Robbins basic pathology: Elsevier Health Sciences*; 2012.
7. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2014;105:141-50.
8. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116:1793.
9. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 2012;481:278-86.
10. Vandanmagsar B, Youm Y-H, Ravussin A et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature medicine*. 2011;17:179-88.
11. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140:821-32.
12. Lee H-M, Kim J-J, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo E-K. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013;62:194-204.
13. Jourdan T, Godlewski G, Cinar R et al. Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nature medicine*. 2013;19:1132-40.
14. Westwell-Roper C, Nackiewicz D, Dan M, Ehses JA. Toll-like receptors and NLRP3 as central regulators of pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes. *Immunology and cell biology*. 2014;92:314-23.
15. Dixit VD. Nlrp3 inflammasome activation in type 2 diabetes: is it clinically relevant? *Diabetes*. 2013;62:22-4.
16. Shenfield GM. Genetic polymorphisms, drug metabolism and drug concentrations. *Clin Biochem Rev*. 2004;25:203-6.
17. Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol*. 2002;34:275-305.
18. Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ. Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. *Gen*. 2008;21:282-95.
19. Millis MP. Medium-throughput SNP genotyping using mass spectrometry: multiplex SNP genotyping using the iPLEX(R) Gold assay. *Methods Mol Biol*. 2011;700:61-76.
20. Zhang H-x, Wang Z-t, Lu X-x, Wang Y-g, Zhong J, Liu J. NLRP3 gene is associated with ulcerative colitis (UC), but not Crohn's disease (CD), in Chinese Han population. *Inflammation Research*. 2014;63:979-85.
21. Ji X, Hou Z, Wang T et al. Polymorphisms in inflammasome genes and risk of coal workers' pneumoconiosis in a Chinese population. *PLoS One*. 2012;7:e47949.