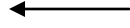


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**SIRT1 VE TİP 2 DİYABET ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
İNCELENMESİ**

ÖZLEM GÖK

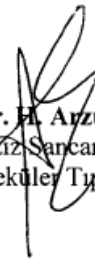
**DANIŞMAN
DOÇ. DR. NESLİHAN ABACI**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Doktora öğrencisi Özlem GÖK tarafından Doç. Dr. Neslihan ABACI'nın danışmanlığında hazırlanan "Sırt1 ve Tip 2 Diyabet Arasındaki İlişkinin İncelenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 06/12/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. H. Arzu ERGEN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp A.D.



Prof. Dr. Ali SAZCI
Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D.



Doç. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Neslihan ABACI
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Emel ERGÜL
Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D.

BEYAN

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

ÖZLEM GÖK

İTHAF

Tezimi sevgili aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenen ve akademik çalışmalarında desteğini esirgemeyip her konuda gösterdiği anlayış ve paylaştığı bilgi birikimiyle yanımda olan değerli hocam İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. Neslihan ABACI'ya,

Doktora sürem boyunca laboratuvar çalışmalarım ve tezim konusunda yardımlarını benden esirgemeyen ve her konuda destek olan İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. Sema Sırma EKMEKÇİ'ye ve Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. Emel ERGÜL'e,

Doktora sürem boyunca yine yardım ve desteğini benden esirgemeyen ve bilgilerini paylaşan İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Sn. Prof. Dr. H. Arzu ERGEN'e,

Tezim için gerekli örneklerin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. Zeynep Ermiş KARAALI'ye,

Tez çalışmam süresince yardımlarından ve desteklerinden ötürü Genetik Anabilim Dalı'nda görevli değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen ve her zaman yanımda olan çok sevdiğim kıymetli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23646

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. DIABETES MELLITUS (ŞEKER HASTALIĞI)	3
2.1.1. Diyabette Tanı Kriterleri ve Tanı Testleri.....	3
2.1.2. Diyabetin Sınıflandırılması	4
2.1.3. Tip 2 Diyabet (T2DM).....	7
2.1.3.1. T2DM'nin risk faktörleri, belirtileri, komplikasyonları, tanı ve tedavisi.....	7
2.1.3.2. T2DM'nin patogenezi ve patofizyolojisi	13
2.2. SİRTUİN GEN AİLESİ	19
2.3. SİRTUİN 1 (SIRT1), İŞLEVLERİ, TİP 2 DİYABETTEKİ ROLÜ.....	21
2.3.1. SIRT1 Geni, Hücrel Lokalizasyonu ve Enzimatik Aktivitesi	21
2.3.2. SIRT1 Geni ve İşlevleri	23
2.3.3. T2DM'nin Patogenezinde SIRT1'in Rolü.....	27
2.3.3.1. SIRT1'in insülin salgılanması ve sinyalizasyonundaki rolü	28
2.3.3.2. SIRT1'in yağ dokudaki rolü	29
2.3.3.3. SIRT1'in iskelet kasındaki rolü.....	30
2.3.3.4. SIRT1'in karaciğerdeki rolü.....	32
2.3.3.5. SIRT1'in oksidatif stres ve inflamasyondaki rolü.....	33
2.4. MikroRNA (miRNA).....	35
2.4.1. miRNA Biyogenezi ve Fonksiyonu.....	35

2.5. DİYABET ve miRNA'LAR ARASINDAKİ İLİŞKİ	37
2.5.1. miRNA'lar ve Pankreatik β -Hücreleri.....	38
2.5.2. miRNA'lar ve İnsülin Sinyal Yolağı.....	39
2.6. SIRT1 EKSPRESYONUNUN miRNA'LAR İLE DÜZENLENMESİ.....	43
2.6.1. SIRT1 Ekspresyonunun miR-34a İle Düzenlenmesi.....	45
2.6.2. Diğer miRNA'lar Tarafından SIRT1 Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	48
3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI VE ELDESİ.....	48
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE GEREÇLER.....	48
3.2.1. Kullanılan Malzemeler	48
3.2.2. Kullanılan Cihazlar.....	49
3.3. KULLANILAN YÖNTEMLER	50
3.3.1. Periferik Kandan Serum Ayrılması.....	50
3.3.2. miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	50
3.3.2.1. RNA izolasyonu.....	51
3.3.2.2. RNA'nın konsantrasyon ve kalitesinin belirlenmesi.....	52
3.3.2.3. miRNA'nın reverse transkriptaz ile çevrimi.....	52
3.3.2.4. Real-Time PCR.....	53
3.3.3. Serum SIRT1 Düzeylerinin Belirlenmesi.....	54
3.3.4. Analiz.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONRASINDA ELDE EDİLEN BULGULAR.....	56
5. TARTIŞMA	71
KAYNAKLAR	79
ETİK KURUL KARARI	95
ÖZGEÇMİŞ	98

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Diabetes mellitus ve glukoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri	4
Tablo 2-2. Diabetes mellitusun etiyolojik sınıflaması.....	5
Tablo 2-3. T2DM'nin risk faktörleri	8
Tablo 2-4. T2DM'nin belirtileri.....	9
Tablo 2-5. Mevcut ve gelecekteki glukoz düşürücü tedavi seçenekleri.....	11
Tablo 2-6. Sirtuin genlerinin özellikleri	20
Tablo 2-7. SIRT1 hedefleri/bağlanma partnerleri ve SIRT1 ekspresyonunun etkileri ...	26
Tablo 2-8. Pankreatik β -hücre fonksiyonunda rol alan temel miRNA'lar	38
Tablo 2-9. İnsülin direncinde rol alan temel miRNA'lar	42
Tablo 2-10. SIRT1'i hedefleyen miRNA'lar	44
Tablo 3-1. miRNA'nın reverse transkriptaz ile çevrimi için karışım bileşenleri ve miktarları.....	52
Tablo 3-2. miRNA'nın reverse transkriptaz ile çevrimi için inkübasyon koşulları	53
Tablo 3-3. Real Time PCR için karışım bileşenleri ve miktarları.....	53
Tablo 3-4. Real Time PCR için inkübasyon koşulları	54
Tablo 4-1. Çalışma gruplarına ait demografik ve klinik bilgiler	57
Tablo 4-2. Serum SIRT1 ve diğer parametreler arasındaki korelasyon	63
Tablo 4-3. Serum miR-181a ve diğer parametreler arasındaki korelasyon	65
Tablo 4-4. Serum miR-132 ve diğer parametreler arasındaki korelasyon	66
Tablo 4-5. Serum miR-9 ve diğer parametreler arasındaki korelasyon.....	67
Tablo 4-6. Serum miR-34a ve diğer parametreler arasındaki korelasyon.....	68
Tablo 4-7. Kontrol grubunda cinsiyete göre SIRT1 proteini ve miRNA ifade düzeyleri.....	69
Tablo 4-8. Kontrol grubunda sigara kullanan ve kullanmayanlar arasında SIRT1 proteini ve miRNA ifade düzeyleri.....	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. T2DM'nin komplikasyonları.....	10
Şekil 2-2. T2DM'nin patogenezi	14
Şekil 2-3. T2DM'nin patogenezinde rol alan risk faktörleri	15
Şekil 2-4. T2DM'nin patogenezinde dokuların katkısı (A).....	18
Şekil 2-5. T2DM'nin patogenezinde dokuların katkısı (B)	18
Şekil 2-6. Sirtuinler ve ilişkili hastalıklar	21
Şekil 2-7. SIRT1'in enzimatik aktiviteleri.....	22
Şekil 2-8. SIRT1'in biyolojik fonksiyonları	23
Şekil 2-9. SIRT1'in ilişkili olduğu dokulardaki işlevleri	24
Şekil 2-10. Tip 2 diyabetin patogenezinde SIRT1'in etkisi	28
Şekil 2-11. SIRT1'in insülin salgılanması, β hücrelerinin korunması ve insülin sinyalizasyonundaki etkisi	29
Şekil 2-12. SIRT1'in yağ dokudaki etkisi	30
Şekil 2-13. SIRT1'in iskelet kasındaki etkisi	31
Şekil 2-14. SIRT1'in karaciğerdeki etkisi	33
Şekil 2-15. SIRT1'in oksidatif stres ve inflamasyondaki etkisi (A)	34
Şekil 2-16. SIRT1'in oksidatif stres ve inflamasyondaki etkisi (B)	34
Şekil 2-17. miRNA'ların biyogenezi ve mekanizması.....	36
Şekil 2-18. İnsülin sinyal yolağındaki proteinler ve miRNA'lar	41
Şekil 4-1. Analiz edilen miRNA'lara ait amplifikasyon eğrileri	59
Şekil 4-2. Hasta ve kontrol gruplarında miRNA ifade düzeyleri (A. miR-181a, B. miR-132, C. miR-9 ve D. miR-34a).....	60
Şekil 4-3. ELISA deneyine ait standart eğrisi.....	61
Şekil 4-4. Hasta ve kontrol gruplarında serum SIRT1 düzeyleri.....	62

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Abca1: ATP bağlayıcı kaset subfamilya A üye 1

Ac: Asetilasyon

ACR: Albümin/kreatinin oranı

ADP: Adenozin difosfat

Ago 2: Argonaute 2

Akt: Protein kinaz B

ALP: Alkalen fosfataz

ALT: Alanin aminotransferaz

APG: Açlık plazma glukozu

ASK1: Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1

AST: Aspartat aminotransferaz

Atg: Otofajiyle ilişkili gen

ATP: Adenosin trifosfat

BAG: Bozulmuş açlık glukozu

Bcl-2: B hücreli lenfoma-2

BGT: Bozulmuş glukoz toleransı

BIM: Bcl-2 benzeri protein 11

BMAL1: Beyin ve kas aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator benzeri 1

BMI: Vücut kitle indeksi

Ca: Kalsiyum

Cadml: Hücre adhezyon molekülü 1

C/EBP α : CCAAT/Hızlandırıcı bağlayıcı protein

CREB: cAMP cevap elementi bağlayıcı protein

CRP: C-reaktif protein

CRTC2: CREB-regüle edilmiş transkripsiyon koaktivatör 2

Ct: Döngü eşik değeri (Cycle threshold)

CV: Kardiyovasküler

DGCR8: DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8

dl: Desilitre

DM: Diabetes mellitus

DPP-IV: Dipeptidil peptidaz-IV

eGFR: Glomerüler filtrasyon hızı

ELISA: Enzim ilintili immün test

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz

Exportin-5: Nükleer taşıma reseptörü

FFA: Serbest yağ asidi

Fgf-21: Fibroblast büyüme faktörü 21

Foxa2: Forkhead box protein A2

FOXO1: Forkhead box class O1

FXR: Farnesoid X reseptörü

GADD45: Büyümenin durdurulması ve DNA hasarı-indüklenebilir 45

GDM: Gestasyonel diabetes mellitus

GGT: Gama glutamil transferaz

GIP: Gastrik inhibitör peptid

GLP-1: Glukagon-benzeri peptid-1

GLUT4: Glukoz taşıyıcı 4

GTP: Guanozin trifosfat

HbA1c: Glikozillenmiş hemoglobin

HCT: Hematokrit

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

HGB: Hemoglobin

HIF: Hipoksiyle indüklenen faktör

HIPK3: Homeodomain-etkileşen protein kinaz 3

Hnf1a: Hepatosit nükleer faktör 1 homeobox A

HNF1β: Hepatosit nükleer faktör 1 homeobox β

HOMA-IR: İnsülin direnci

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

HUVEC: İnsan umbilikal ven endotel hücresi

IDF: Uluslararası Diyabet Federasyonu

IFCC: Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıp Federasyonu

IFG: Açlık glisemi bozukluğu

IGT: Bozulmuş glukoz toleransı

IL-6: İnterlökin-6

INS: İnsülin

INSR: İnsülin reseptörü

IRS-1: İnsülin reseptör substratı 1

IRS-2: İnsülin reseptör substratı 2

JNK: c-Jun N-terminal kinaz

KC: Keratinosit kemoatraktan

KCl: Potasyum klorür

LC3: Hafif zincir 3

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

LKB1: Karaciğer kinaz B1

LXR: Karaciğer X reseptörü

MCP-1: Monosit kemoatraktan protein-1

Mct1: Monokarboksilat taşıyıcı 1

Mfn2: Mitofusin 2

mg: Miligram

MIN-6: Pankreatik beta hücre hattı

miRNA: MikroRNA

MnSOD: Manganeze bağlı süperoksit dismutaz

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

Mtpn: Myotrophin

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NCoR: Nükleer reseptör korepresör

NEFA: Esterleşmemiş yağ asitleri

Neurod1: Nörojenik farklılaşma 1

NF- κ B: Nükleer faktör-Kb

ng: Nanogram

NGT: Normal glukoz toleransı

OAADPr: O-asetil-ADP-riboz

OD: Optik densite

OGTT: Oral glukoz tolerans testi

ORF: Açık okuma çerçevesi

Orp8: Oksisterol bağlayıcı protein benzeri 8

OXPHOS: Oksidatif fosforilasyon

P: Fosfor

PARP1: Poli (ADP-riboz) polimeraz-1

PAX6: Paired box 6

PCAF: P300/CBP ile ilişkili faktör

Pdgfra: Trombosit türevi büyüme faktörü reseptörü, α polipeptid

PER2: Periyod 2

PGC-1 α : Peroksizom proliferatör-aktif reseptör gamma koaktivatör-1 α

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat

PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat

PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz

PLT: Platelet

PPAR- α : Peroksizom proliferatör-aktif reseptör- α

PPAR- γ : Peroksizom proliferatör-aktif reseptör- γ

PPAR- δ : Peroksizom proliferatör-aktif reseptör- δ

pre-miRNA: Prekürsör mikroRNA

pri-miRNA: Primer mikroRNA

PTEN: Fosfataz ve tensin homologu

PTP1B: Tirozin fosfataz 1B

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)

p21: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A

p53: Tümör protein 53

qRT-PCR: Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu

Rab27a: Ras ile ilgili protein Rab-27A

RAN: RAs-ilişkili nükleer protein

RBC: Kırmızı kan hücresi

Real-Time PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

RFX6: Düzenleyici faktör X6

RISC: RNA-indüklenmiş susturma kompleksi

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türleri

RQ: Rölatif kantitasyon

SGLT-1: Sodyum glukoz birlikte taşıyıcı-1

SGLT-2: Sodyum glukoz birlikte taşıyıcı-2

SH2: Src homoloji 2

SIRT: Sirtuin

SIRT1: Sirtuin 1

SMRT: Retinoid ve tiroid hormon reseptörleri susturma aracı

SOX6: Cinsiyet belirleme bölgesi Y-box 6

SREBP1: Sterol düzenleyici element bağlama proteini1

SSPG: Sabit durum plazma glukozu

STAT3: Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü 3

Stx-1: Syntaxin 1

TNF- α : Tümör nekroz faktörü- α

TORC1: Düzenlenen CREB 1 transdüseri

T1DM: Tip 1 diyabet

T2DM: Tip 2 diyabet

UCP 2: Ayrıştırma proteini geni 2

μ l: Mikrolitre

UTR: Translasyona uğramayan bölge

WBC: Beyaz kan hücresi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Gök, Ö. (2017). SIRT1 ve Tip 2 Diyabet Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Diyabet, insülin sekresyonu ve/veya insülin etkisindeki kusurlardan kaynaklanan ve hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bir hastalıktır. Diyabet tanısı alan hastaların yaklaşık %90'ında görülen T2DM, pankreatik β hücresi disfonksiyonu ve insülin direncinin neden olduğu insülin eksikliği ile karakterizedir. Sirtuin ailesine ait olan ve deasetilaz olarak görev yapan SIRT1, glukoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde çok önemlidir. Bu çalışmada, 25 T2DM ve 25 kontrol grubu bireyin serum örneklerinde SIRT1 protein düzeyi ve SIRT1 regülasyonunda rol alan miRNA'ların (miR-34a, miR-217, miR-9, miR-132 ve miR-181a) ifade düzeylerini incelemek için ELISA ve Real-Time PCR yöntemleri kullanılmıştır. Hasta grubunda açlık kan glukozu ($p<0,001$) ve HbA1c ($p<0,001$) düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu belirlenmiştir. İki grup arasında miRNA ifade düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$) hasta grubunda SIRT1 düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,044$). Ayrıca, SIRT1'in hasta grubunda miR-181a ($p=0,005$) ve miR-132 ($p=0,034$) ile anlamlı olarak negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Tüm bu bulgular miR-181a ve miR-132'nin diyabetik bireylerde SIRT1 ile ilişkili olduğunu, SIRT1 artışının hastalıkla ilişkili olabileceğini ve serum SIRT1 proteininin T2DM'nin patogenezinde yeni bir biyobelirteç olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma, SIRT1'in Türk T2DM hastalarındaki etkisinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Çalışmamız Türk popülasyonunda serum SIRT1 proteini ve SIRT1 regülasyonunda rol alan miRNA'lar ile ilgili ilk verileri sunmuş olup, bu verilerin daha sonra yapılacak olan çalışmalara öncülük edeceğine inanmaktayız.

Anahtar Kelimeler: Sirtuin 1 (SIRT1), tip 2 diyabet (T2DM), serum, mikroRNA (miRNA), biyobelirteç

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23646

ABSTRACT

Gok, O. (2017). The Investigation of Relationship Between SIRT1 and Type 2 Diabetes. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Doctoral Thesis. İstanbul.

Diabetes is a metabolic disease resulting from defects in insulin secretion and/or insulin action and characterized by hyperglycemia. T2DM, which is seen in approximately 90% of patients who are diagnosed with diabetes, is characterized by insulin deficiency caused by pancreatic β cell dysfunction and insulin resistance. SIRT1, belonging to Sirtuin family and serving as deacetylase, is very important in the regulation of glucose and lipid metabolism. In this study, ELISA and Real Time PCR methods were used to examine SIRT1 protein levels and expression levels of miRNAs (miR-34a, miR-217, miR-9, miR-132 and miR-181a) involved in SIRT1 regulation in serum samples of 25 T2DM and 25 control group individuals. It was determined that fasting blood glucose ($p<0,001$) and HbA1c ($p<0,001$) levels were significantly higher in the patient group than the control group. While there was no significant difference in miRNA expression levels between the two groups ($p>0,05$), the SIRT1 level was significantly higher in the patient group than the control group ($p=0,044$). In addition, it was detected that SIRT1 showed a significant negative correlation with miR-181a ($p=0,005$) and miR-132 ($p=0,034$) in the patient group. All these findings indicate that miR-181a and miR-132 are associated with SIRT1 in diabetic individuals, the increase in SIRT1 may be related to disease and serum SIRT1 protein has the potential to be a new biomarker in the pathogenesis of T2DM.

This is the first study to evaluate the effect of SIRT1 in Turkish T2DM patients. Our study reveals the first data about serum SIRT1 protein and miRNAs involved in SIRT1 regulation in the Turkish population and we believe that this study will play a pioneering role for the next studies.

Key Words: Sirtuin 1 (SIRT1), type 2 diabetes (T2DM), serum, microRNA (miRNA), biomarker

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: 23646

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet, genetik ve çevresel etkenlerin birleşimi ile oluşan ve hiperglisemi ile karakterize edilen ilerleyici metabolik bir hastalıktır ve insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre dünya genelinde diyabet hastalığına yakalanmış 400 milyondan fazla insan bulunmakta olup bu sayının 2030'a kadar 552 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (1,2).

Diyabet birkaç çeşide sınıflandırılabilir, ancak diyabet vakalarının büyük çoğunluğunu tip 1 diyabet (T1DM) ve tip 2 diyabet (T2DM) oluşturmaktadır (3). Diyabetli hastaların %90'dan fazlasında görülen T2DM, insülin direnci ve insülin sekresyon bozukluğu ile karakterizedir ve bir takım makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlara yol açmaktadır (4,5). Pankreatik β hücrelerindeki bozukluklar ve insülin direnci T2DM'nin patogeneğinde yer alan en önemli özelliklerdir. Hücre-reseptör defektine bağlı olarak insülinin kullanımındaki sorunlardan dolayı glukoz hücre içine giremez. Özellikle kas ve yağ dokusunda insülinin etkisi yetersiz kalır. Pankreas ise yeteri kadar insülin salgılayamaz ve karaciğerde glukoz yapımı artar. Ayrıca, insülin üreten β hücreleri artmış insülin direncini telafi edemediği zaman glukoz homeostazı bozulur ve sonuçta T2DM gelişir (4,6,7).

Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) bağımlı olarak görev yapan Sirtuin (SIRT) ailesine ait genler ilk olarak mayada ve daha sonra bakterilerde, sineklerde, solucanlarda, bitkilerde ve memelilerde tanımlanmıştır. SIRT genlerinin memelilerde 7 varyantı (SIRT1-SIRT7) bulunmaktadır ve bu genler arasında en dayanıklı deasetilaz aktivitesine sahip olan gen SIRT1'dir (8-12). Posttranslasyonel modifikasyonlardaki asetilasyon ve deasetilasyon arasındaki dengeyi sağlamaya yardımcı olan ve sınıf I histon deasetilaz olarak görev yapan SIRT1, glukoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır. SIRT1, pankreasta β hücrelerinin korunmasını ve insülin salgılanmasını, karaciğerde glukoneogenezi ve yağ asidi oksidasyonunu, yağ dokuda lipid mobilizasyonunu ve iskelet kasında ise mitokondriyal biyogenezi ve glukoz alımını arttırmaktadır. Ayrıca, mitokondride reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini azaltırken biyogenezi ve yağ asidi oksidasyonunu düzenlemektedir (Pubmed,6,13-15).

MikroRNA (miRNA)'lar transkripsiyonu olan fakat translasyonu gerçekleştirilmeyen küçük, tek sarmallı ve 21-24 nükleotid uzunluğunda olan fonksiyonel ribonükleik asit (RNA) molekülleridir. Genel olarak bir veya birden fazla hedef geni baskılayarak translasyonun engellenmesine ve/veya ilgili mesajcı ribonükleik asidin (mRNA) yıkılmasına neden olurlar. Hedef mRNA'lara etki ederek ilgili genlerin ekspresyonlarını regüle ederler. Hücrel gelişim, farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerde önemli rol oynarlar (16,17). Son zamanlarda miRNA'ların hücreler tarafından salgılanabildiği, böylece serumda ve diğer biyolojik sıvılarda saptanabildiği gösterilmiştir. Özellikle hiperglisemi ile karakterize olan T2DM ile ilgili miRNA'ların belirlenmesi amacıyla tüm kan, serum, plazma, idrar, periferik kan mononükleer hücreler ve endotelial progenitör hücreler üzerinde bir takım çalışmalar yapılmış ve ilgili miRNA'lar incelenmiştir (18,19).

miR-34a ve miR-217 genleri SIRT1 ekspresyonunu inhibe ederler ve ayrıca endotelial yaşlanma, angiogenez ve aterosklerozda oldukça önemlidirler (20,21). miR-9, miR-132 ve miR-181a genlerinin de glukoz metabolizmasında önemli oldukları literatürden bilinmektedir (21,22).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda miRNA'ların SIRT1 ekspresyonunu kontrol ettiği ve endotelial yaşlanma ve glukoz metabolizmasında önemli oldukları gösterilmiştir (21,22). Ancak, T2DM ve SIRT1 ekspresyonunun nasıl düzenlendiği konusunda bilgiler yetersiz olup henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Bu tez çalışmasında T2DM tanısı konulmuş hasta ve kontrol grubu bireylerde SIRT1 protein regülasyonunda rol oynayan miRNA genlerinin (miR-34a, miR-217, miR-9, miR-132 ve miR-181a) ekspresyon seviyeleri ve SIRT1 protein seviyesinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DIABETES MELLITUS (ŞEKER HASTALIĞI)

Diyabet, insülin sekresyonu ve/veya insülin etkisindeki kusurlardan kaynaklanan ve hiperglisemi ile karakterize edilen bir metabolik hastalık grubudur ve insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Dünya genelinde 415 milyon insan diyabetli olarak yaşamaktadır ve tahmini olarak tanı konulmamış 193 milyon diyabetli insan bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre ise dünya genelinde diyabet hastalığına yakalanmış 400 milyondan fazla insan bulunmakta olup bu sayının 2030'a kadar 552 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (1,3,5,23). Yaklaşık olarak 3000 yıl önce eski Mısırlılar tarafından rapor edilen diyabetin gelişiminde insülin eksikliği ile insülin direnci gibi nedenlerden kaynaklanan ve özellikle gözleri, böbrekleri, sinirleri, kalp ve kan damarlarını etkileyen bir takım patolojik süreçler rol oynar (3,24).

Diyabette karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki anormalliklerin temelini hedef dokularda insülinin eksik etkisi oluşturmaktadır. Eksik insülin etkisi ise yetersiz insülin sekresyonundan ve/veya bir veya daha fazla noktada insüline verilen doku yanıtlarının azalmasından kaynaklanır (3).

2.1.1. Diyabette Tanı Kriterleri ve Tanı Testleri

Tanı testlerinin yapılması ve sonuçların varsa belirtiler ve komplikasyonlar ile birlikte değerlendirilmesi diyabet tanısının konulması açısından oldukça önemlidir. Genellikle tanı koymak için laboratuvar şartlarında kan glukoz ölçümü ve glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c) testleri yapılır. Glisemi, venöz plazmada miligram/desilitre (mg/dl) olarak ölçülür ve glukoz oksidaz yöntemi ile yapılan ölçümler dikkate alınır. Açık Diabetes Mellitus (DM) tanısı için Tablo 2-1'de belirtilen dört tanı kriterinden herhangi birisi yeterli olup diyabet tanısı dört yöntemden herhangi birisi ile konulabilir. Ancak izole bozulmuş açlık glukozu (BAG), izole bozulmuş glukoz toleransı (BGT) ve BAG + BGT için her iki kriterin bulunması gereklidir. Ayrıca, HbA1c testi de oldukça önemli bir tanı testidir ve standardize metotlarla ölçülür (4).

Tablo 2-1. Diabetes mellitus ve glukoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri (4)

	Aşık DM	İzole BAG	İzole BGT	BAG + BGT	DM Riski Yüksek
APG (≥8st açlıkta)	≥126 mg/dl	100-125 mg/dl	<100 mg/dl	100-125 mg/dl	
OGTT 2.st PG (75 g glukoz)	≥200 mg/dl	<140 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	
Rastgele PG	≥200 mg/dl + Diyabet Semptomları				
A1C	≥%6.5 (≥48 mmol/mol)				%5.7-6.4 (39-46 mmol/mol)

2006 yılı WHO/IDF Raporunda normal APG kesim noktasının 110 mg/dl ve BAG 110-125 mg/dl olarak korunması benimsenmiştir.

DM: Diabetes mellitus, APG: Açlık plazma glukozu, 2.st PG: 2. saat plazma glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, A1C: Glikozillenmiş hemoglobinin A_{1c}, BAG: Bozulmuş açlık glukozu, BGT: Bozulmuş glukoz toleransı, WHO: Dünya Sağlık Örgütü, IDF: Uluslararası Diyabet Federasyonu

2.1.2. Diyabetin Sınıflandırılması

Diyabet birkaç çeşide sınıflandırılabilir, ancak diyabet vakalarının büyük çoğunluğu tip 1 diyabet (T1DM) ve tip 2 diyabet (T2DM) olmak üzere iki etyopatogenetik kategoriye girmektedir. 1936'da T1DM ve T2DM arasındaki fark açık bir biçimde tanımlanmıştır (3,25).

Diyabet tanısı alan hastaların %5-10'unda T1DM ve yaklaşık %90'ında ise T2DM görülür. T1DM, pankreasta adacık hücreleri tarafından yeterli miktarda insülinin üretilmemesi nedeniyle yüksek kan şekeri seviyesi ile sonuçlanan bir şeker hastalığı formu olup mutlak insülin eksikliği söz konusudur. Hastaların %90'ında otoimmün (Tip 1A), %10 kadarında ise nonotoimmün (Tip 1B) β-hücre yıkımının olduğu ve pankreatik β hücresi kaybından dolayı insülin eksikliğinin görüldüğü bu bozukluk, çoğu durumda bağışıklık sisteminin yanlışlıkla pankreastaki insülin üreten hücrelere saldırdığı

otoimmün bir hastalıktır. T1DM çoğunlukla çocuklar, ergenler veya genç erişkinlerde teşhis edilir. İnsülin sekresyonunun eksikliği ile karakterize olan T1DM'nin kesin nedeni hala bilinmemektedir (3,4,25,26). Yüksek kan şekeri, insülin direnci ve insülin sekresyon bozukluğu ile karakterize olan T2DM ise daha yaygın olarak görülür, etyolojisi karmaşıktır ve yaş, genetik, ırk, etnik yapı, diyet, fiziksel aktivite ve sigara gibi faktörler ile ilişkilidir. T1DM'den farklı olarak, T2DM genellikle yetişkinlerde görülür (Tablo 2-2) (3,4,27,28).

Tablo 2-2. Diabetes mellitusun etiyolojik sınıflaması (4)

I. Tip 1 diyabet (Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan β -hücre yıkımı vardır.)	
A. İmmün aracılıklı	
B. İdiyopatik	
II. Tip 2 diyabet (İnsülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir.)	
III. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM) (Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabettir.)	
IV. Diğer spesifik diyabet tipleri	
<u>A. β-hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları)</u> 20. Kromozom, HNF-4a (MODY1) 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2) 12. Kromozom, HNF-1a (MODY3) 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4) 17. Kromozom, HNF-1b (MODY5) 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6) 2. Kromozom, KLF11 (MODY7) 9. Kromozom, CEL (MODY8) 7. Kromozom, PAX4 (MODY9) 11. Kromozom, INS (MODY10) 8. Kromozom, BLK (MODY11) - Mitokondriyal DNA 11. Kromozom, Neonatal DM (Kir6.2, ABCC8, KCNJ11 mutasyonu) - Diğerleri	<u>B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler</u> - Leprechaunism - Lipoatrofik diyabet - Rabson-Mendenhall sendromu - Tip A insülin direnci - Diğerleri

<u>C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları</u> ▪ Fibrokalkulöz pankreatopati ▪ Hemokromatoz ▪ Kistik fibroz ▪ Neoplazi ▪ Pankreatit ▪ Travma/pankreatektomi ▪ Diğerleri	<u>D. Endokrinopatiler</u> ▪ Akromegali ▪ Aldosteronoma ▪ Cushing sendromu ▪ Feokromositoma ▪ Glukagonoma ▪ Hipertiroidi ▪ Somatostatinoma ▪ Diğerleri
<u>E. İlaç veya kimyasal ajanlar</u> ▪ Atipik anti-psikotikler ▪ Anti-viral ilaçlar ▪ β-adrenerjik agonistler ▪ Diazoksid ▪ Fenitoin ▪ Glukokortikoidler ▪ α-İnterferon ▪ Nikotinik asit ▪ Pentamidin ▪ Proteaz inhibitörleri ▪ Tiyazid grubu diüretikler ▪ Tiroid hormonu ▪ Vacor ▪ Statinler ▪ Diğerleri (Transplant rejeksiyonunu önlemek için kullanılan ilaçlar)	<u>F. İmmün aracılıklı nadir diyabet formları</u> ▪ Anti insülin-reseptör antikorları ▪ “Stiff-man” sendromu ▪ Diğerleri
<u>G. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar</u> ▪ Alström sendromu ▪ Down sendromu ▪ Friedreich tipi ataksi ▪ Huntington korea ▪ Klinefelter sendromu ▪ Laurence-Moon-Biedl sendromu ▪ Miyotonik distrofi ▪ Porfiria ▪ Prader-Willi sendromu ▪ Turner sendromu ▪ Wolfram (DIDMOAD) sendromu ▪ Diğerleri	<u>H. Enfeksiyonlar</u> ▪ Konjenital rubella ▪ Sitomegalovirus ▪ Koksaki B ▪ Diğerleri (adenovirus, kabakulak)

2.1.3. Tip 2 Diyabet (T2DM)

Diyabetli hastaların %90'dan fazlasında görülen T2DM insülin direnci ve insülin sekresyon bozukluğu ile karakterizedir ve bir takım makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlara yol açar (4,5). T2DM, pankreatik β hücresi disfonksiyonu ve insülin direncinin neden olduğu insülin eksikliği ile karakterizedir. Hücre-reseptör defektine bağlı olarak insülinin kullanımındaki sorunlardan dolayı glukoz hücre içine giremez. Özellikle kas ve yağ dokusunda insülinin etkisi yetersiz kalır. Pankreas ise yeteri kadar insülin salgılayamaz ve karaciğerde glukoz yapımı artar (4,7).

Genellikle 30 yaş sonrası ortaya çıkan T2DM, son yıllarda çocukluk veya adolesan çağlarında da ortaya çıkmaya başlamıştır. Yaş, genetik, ırk, etnik yapı, diyet, fiziksel aktivite ve sigara kullanımı gibi faktörler ile ilişkilidir. Pek çok hastada başlangıçta hiçbir belirti yoktur ve asemptomatiktir. Bazı hastalar ise görme problemleri, ayak ağrıları, el ve ayaklarda uyuşma ve karıncalanma veya yara iyileşmesinde gecikme gibi şikayetler nedeniyle hastaneye başvuruda bulunabilir. Tedavisinde ise kilo kontrolü, diyet, fiziksel aktivite, oral ilaçlar, insülin ve hastalığa eşlik eden hipertansiyon, dislipidemi gibi bozuklukların tedavisinde kullanılan ilaçlar söz konusudur (4,28).

2.1.3.1. T2DM'nin risk faktörleri, belirtileri, komplikasyonları, tanı ve tedavisi

İnsülin direnci ve insülin sekresyonunda azalma ile ilişkilendirilen T2DM'nin prevalansı katlanarak artmakta olup gelişmekte olan ülkelerde ve popülasyonlarda yüksek bir yaygınlık oranı söz konusudur (4,29). T2DM, obezite ve hareketsiz yaşam tarzı gibi risk faktörlerinin yanı sıra karmaşık bir kalıtım-çevre etkileşiminden kaynaklanan ciddi ve yaygın bir kronik hastalıktır (29). Bu nedenle T2DM risk faktörlerinin belirlenmesi oldukça önemlidir (Tablo 2-3) (28,30,31).

Tablo 2-3. T2DM'nin risk faktörleri (28,30,31)

Aile öyküsü ve genetik
Yaş
İrk/etnik köken
Aşırı kilo ve obezite
Sigara kullanımı
Hipertansiyon varlığı
Son günlerdeki kilo artışı
Hareketsiz yaşam tarzı ve fiziksel aktivite eksikliği
Gestasyonel diyabet
Daha önce tanımlanmış IFG veya IGT
Lipid profilleri (HDL kolesterol ve/veya trigliserid seviyeleri gibi)
Vasküler hastalık öyküsü
Polikistik over sendromu

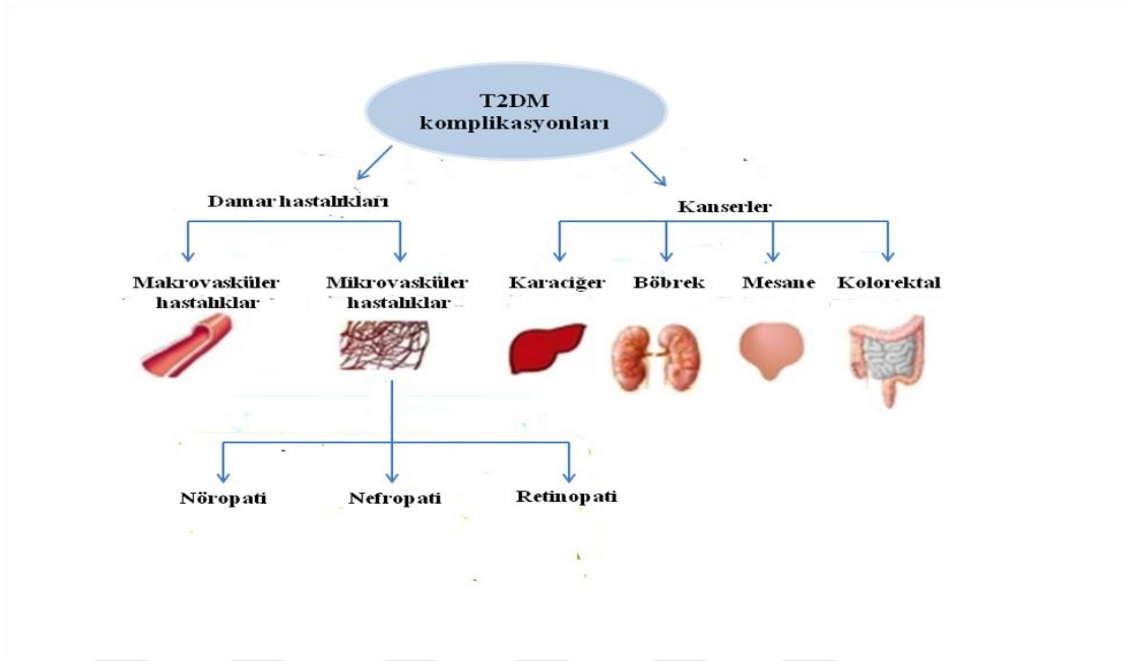
IFG: Açlık glisemi bozukluğu, IGT: Bozulmuş glukoz toleransı, HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

Hiperglisemi ile karakterize edilen T2DM'nin belirtileri çok çeşitlidir (Tablo 2-4). Genellikle erken evrelerinde asemptomatiktir ve uzun yıllar tanı konulamamış olabilir (3,30,31). Diyabetin klasik semptomları arasında yer alan poliüri, polidipsi ve polifaji T1DM ve T2DM'de görülür. Ciddi kilo kaybı T1DM'de veya eğer T2DM uzun süre algılanmazsa görülür. Açıklanamayan kilo kaybı, yorgunluk, huzursuzluk ve vücut ağrısı da saptanmamış diyabetin belirtileri arasında yer alır (31).

Tablo 2-4. T2DM'nin belirtileri (3,31)

Açıklanamayan kilo kaybı
Sık yorgunluk
Sinirlilik
Ağız kuruluğu
Görmenin azalması, bulanık görme
Ateş, ağrı, ayakta uyuşma
Kaşıntı
Tekrarlanan enfeksiyonlar: genital bölgeler, idrar yolu, deri, ağız boşluğu, gecikmiş yara iyileşmesi
Reaktif hipoglisemi
Boyun ve kasıktaki kadifemsi koyu lekelerin varlığı

T2DM hastaları, hem kısa hem de uzun dönem komplikasyonların farklı formlarına duyarlıdır. Hipertansiyon, hiperlipidemi, kalp krizi, koroner arter hastalığı, inme, serebral vasküler hastalık ve periferik damar hastalığı gibi makrovasküler hastalıklar, retinopati, nefropati ve nöropati gibi mikrovasküler hastalıklar ve kanserler komplikasyonlar arasında yer alır (Şekil 2-1) (29).



Şekil 2-1. T2DM'nin komplikasyonları (29)

T2DM'nin tanısını koymak için kan glukoz ölçümü ve HbA1c gibi testlerin yapılması ve sonuçların varsa belirtiler ve komplikasyonlar ile birlikte değerlendirilmesi gerekir (4). T2DM'nin tedavisinde ise oral antidiyabetik ilaçlar ve gerekirse insülin, kilo kontrolü, diyet, fiziksel aktivite ve hastalığa eşlik eden hipertansiyon, dislipidemi gibi bozukluklarda kullanılan ilaçlar söz konusudur. Bu nedenle mevcut ve gelecekteki glukoz düşürücü tedavi seçenekleri oldukça önem taşımaktadır (Tablo 2-5) (4,5).

Tablo 2-5. Mevcut ve gelecekteki glukoz düşürücü tedavi seçenekleri (5)

	Patofizyolojik defekt	Glukoz düşürücü tedavi	
		<u>Mevcut</u>	<u>Gelecek (faz 1-3 klinik çalışmalar)</u>
Pankreatik β hücresi	Hücre kütlesi ve fonksiyonunun kaybı, bozulmuş insülin sekresyonu	Sulfonilüreler, meglitinidler	Imeglimin
Pankreatik α hücresi	Düzensiz glukagon salgısı, artmış glukagon konsantrasyonu	GLP-1 reseptör agonisti	Glukagon-reseptör antagonistleri
İnkretin	İnkretin yanıtın azalması	GLP-1 reseptör agonisti, DPP-IV inhibitörleri	Oral GLP-1 reseptör agonisti, haftada bir kez DPP-IV inhibitörleri
İnflamasyon	İmmün bozukluk	GLP-1 reseptör agonisti, DPP-IV inhibitörleri	İmmün modülatörleri, antienflamatuar ajanlar
Karaciğer	Artmış hepatik glukoz çıkışı	Metformin, pioglitazon	Glukagon-reseptör antagonistleri
Kas	Azalmış periferik glukoz alımı, insülin direnci	Metformin, pioglitazon	Seçici PPAR modülatörleri

Yağ doku	Azalmış periferik glukoz alımı, insülin direnci	Metformin, pioglitazon	Seçici PPAR modülatörleri, FGF21 analogları, yağ asidi reseptör agonistleri
Böbrek	SGLT-2 reseptörlerinin upregülasyonunun neden olduğu artmış glukoz reabsorpsiyonu	SGLT-2 inhibitörleri	Birleşik SGLT-1/-2 inhibitörleri
Beyin	İştah artışı, tokluk eksikliği	GLP-1 reseptör agonisti	GLP-1-glukagon-gastrik inhibitör peptid çift veya üçlü agonistleri
Mide veya bağırsak	Artan glukoz emilim hızı	GLP-1 reseptör agonisti, DPP-IV inhibitörleri, alfa-glukozidaz inhibitörleri, pramlintid	SGLT-1 inhibitörleri
Kolon (mikrobiyom)	Anormal bağırsak mikrobiyotası	Metformin, GLP-1 reseptör agonisti, DPP-IV inhibitörleri	Probiyotikler

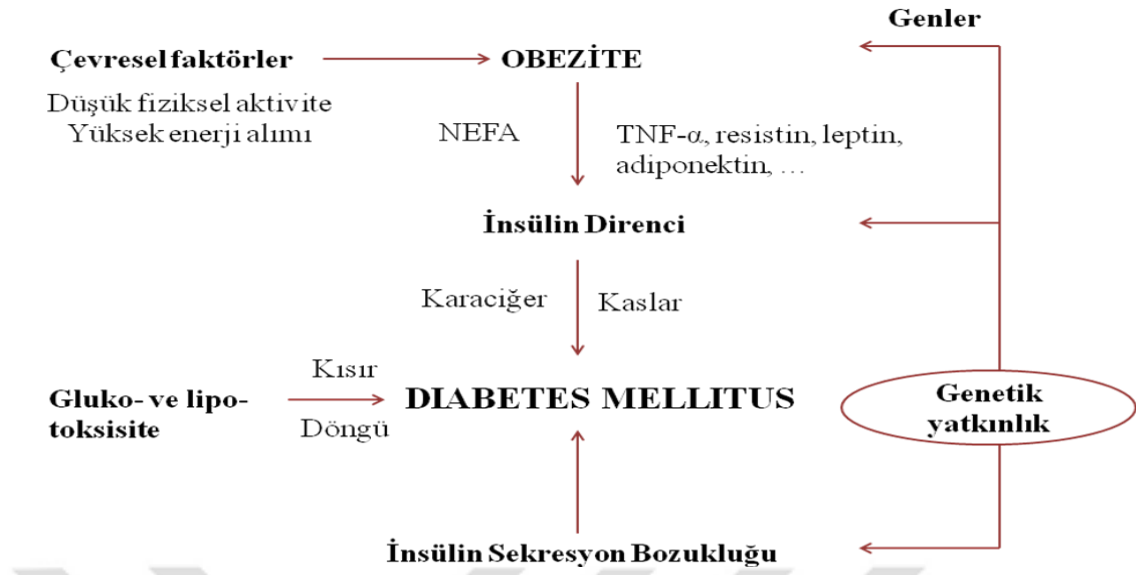
GLP-1: Glukagon-benzeri peptid-1, DPP-IV inhibitörleri: Dipeptidil peptidaz-IV inhibitörleri, GIP: Gastrik inhibitör peptid, SGLT-1/SGLT-2 inhibitörleri: Sodyum glukoz birlikte taşıyıcı-1/sodyum glukoz birlikte taşıyıcı-2 inhibitörleri, PPAR: Peroksizom proliferatör-aktive reseptör, FGF21: Fibroblast büyüme faktörü 21

2.1.3.2. T2DM'nin patogenezi ve patofizyolojisi

T2DM karbonhidrat ve yağ metabolizmasındaki anormallikler ile karakterize heterojen bir sendromdur. T2DM'nin nedenleri multifaktoriyeldir ve β hücre fonksiyonunu ve doku (kas, karaciğer, yağ dokusu, pankreas) insülin duyarlılığını etkileyen genetik ve çevresel unsurları içerir. Diyabetin patogenezi β -hücre disfonksiyonu ve azalmış insülin duyarlılığı önemli rol oynamakta olup bu iki bozukluğun etkileşimini kontrol eden mekanizmalar belirsizdir (32). Diyabetin moleküler patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamış olup bu durum daha etkili önleme ve tedavi stratejilerine doğru ilerlemeyi zayıflatmaktadır (2).

T2DM'nin ana patofizyolojik özellikleri olan bozulmuş insülin sekresyonu ve artmış insülin direnci bu hastalığın gelişimine katkıda bulunur. Son zamanlarda fonksiyonel pankreatik β hücre kütesinin zamanla azaldığı ve T2DM'nin ilerleyici bir hastalık olduğu yaygın olarak kabul görmüştür. Genetik faktörlere eklenen çeşitli çevresel faktörler hastalığın başlangıcından sorumludur. Bozulmuş insülin sekresyonu düşük glukoz yanıtı ile karakterize olup özellikle postprandiyal faz sekresyonundaki azalma önemli bir patofizyolojik durumdur. Glukolipotoksisite ise tedavi edilmezse fonksiyonel pankreatik β hücre kütesinde azalmaya yol açmaktadır (33).

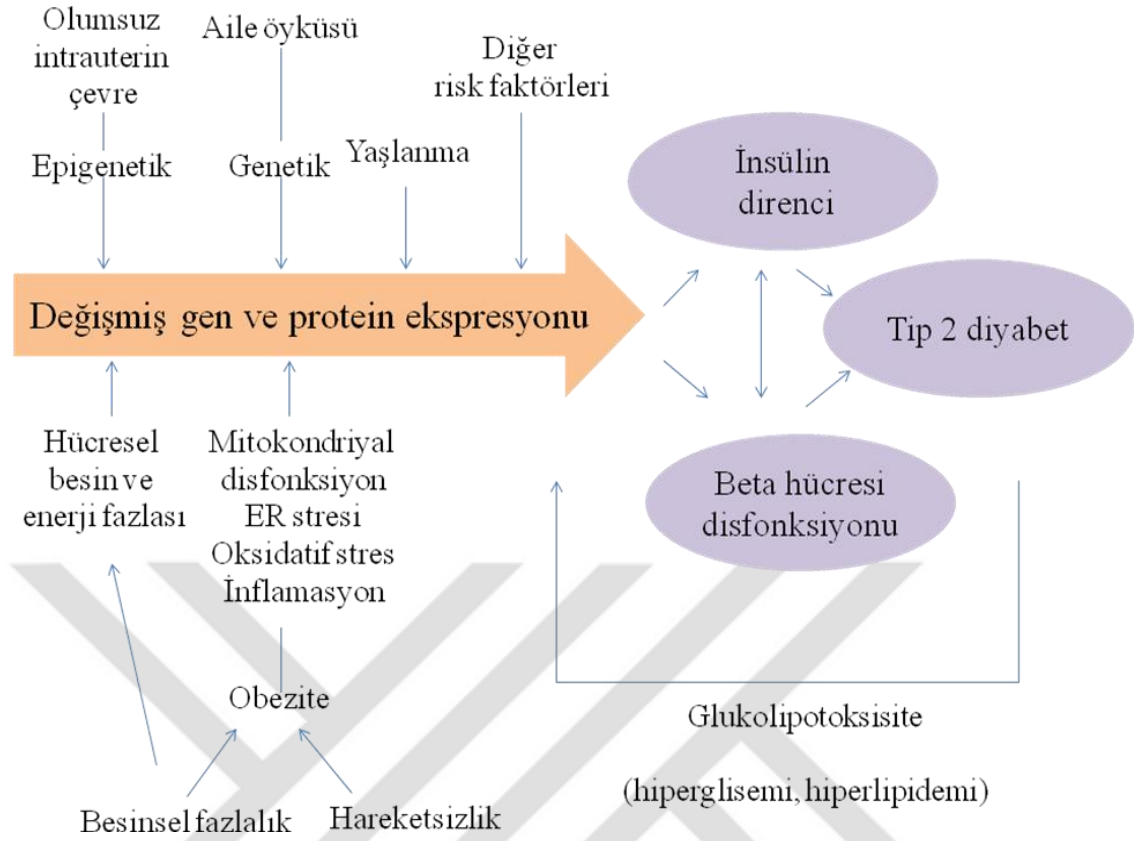
T2DM hem bireysel hem de halk sağlığı düzeyinde büyük sağlık sonuçları doğurarak dünya çapında epidemik oranlara ulaşmıştır (2). Genetik yatkınlığın ve çevre faktörlerinin T2DM'nin patogeneziye katkısı ve defektif insülin sekresyonu ile insülin direnci arasındaki etkileşim, bozulmuş glukoz toleransından T2DM'ye ilerlemeyi açıklayan kısır bir döngüye yol açar (Şekil 2-2) (32).



Şekil 2-2. T2DM'nin patogenezi (32)

TNF- α : Tümör nekroz faktörü- α , NEFA: Esterleşmemiş yağ asitleri

T2DM, bozulmuş insülin sekresyonu ve insülin direnci ile ilişkili genetik ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonundan kaynaklanır. Birden çok gen ve çevresel faktörleri içeren multifaktöriyel bir hastalıktır. Metabolik homeostazda ana dokuların gelişimini etkileyebilen suboptimal intrauterin ortamı ve aşırı beslenme, obezite, hareketsizlik ve yaşlanma gibi postnatal faktörleri içerir. Bu faktörler, β -hücre disfonksiyonu ve insülin direncinin ilerlemesine neden olabilir. T2DM'nin gelişimi aile öyküsü ile ilişkili olup yaşlanma, obezite, yetersiz enerji tüketimi, alkol ve sigara kullanımı gibi etmenler patogenezin bağımsız risk faktörleridir. Diyet enerji kaynaklarındaki değişiklikler özellikle yağ alımındaki artış, nişasta alımındaki azalma, basit şeker tüketimindeki artış ve diyet lifi alımındaki azalma obeziteye katkıda bulunur ve glukoz toleransının bozulmasına neden olur. Hafif obezite (vücut kitle indeksi (BMI)<25) bile viseral yağ kütleindeki artış ile beraber diyabetin gelişme riskinde 4-5 kat artmaya neden olur. Aşırı yeme (özellikle basit şekerlerin aşırı alımı), sigara kullanımı, alkol alımında artış, sinir ve endokrin sistem bozuklukları (kortizolde artış, cinsiyet hormonu sekresyonunda anormallik) gibi stres ile ilişkili faktörler, egzersiz eksikliği nedeniyle azalmış enerji tüketimi, genetik faktörler ve yaşlanma viseral yağda artışa neden olan faktörlerdir. T2DM'nin kompleks patofizyolojisini çözmek glukolipotoksisitenin sekonder etkileriyle karmaşıktır (Şekil 2-3) (2,33,34).



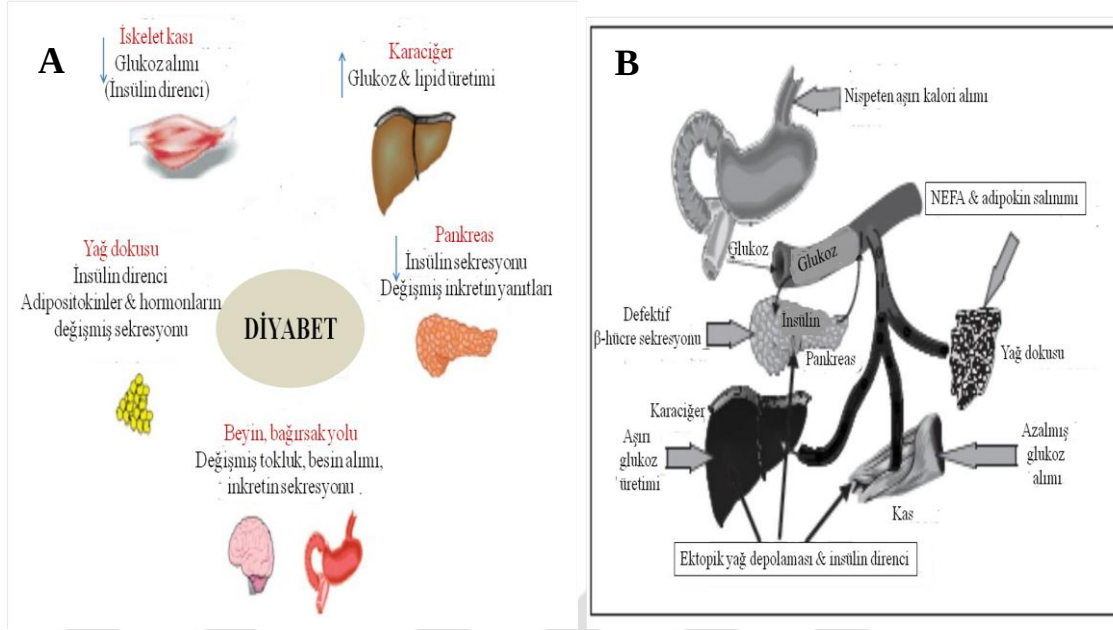
Şekil 2-3. T2DM'nin patogeneğinde rol alan risk faktörleri (2)

Bozulmuş insülin sekresyonu, hastalığın klinik olarak başlamasından önce gözlemlenen glukoz yanıtılığında bir azalmadır. Bozulmuş glukoz toleransı (IGT) glukozu duyarlı erken faz insülin sekresyonunda bir azalma ile indüklenir ve yemeklerden sonra ilave insülin sekresyonundaki bir azalma postprandial hiperglisemiye neden olur. IGT vakalarındaki oral glukoz tolerans testi (OGTT) genellikle insülin direnci belirgin şekilde yüksek olan Batı ve İspanyol bireylerde aşırı yanıt olduğunu gösterir. Diğer yandan, Japon hastalar sıklıkla insülin sekresyonunun azalmasıyla bu teste yanıt verirler. Obeziteye veya diğer faktörlere sahip kişilerde aşırı tepki görüldüğünde bile erken evre salgı yanıtında bir azalma söz konusudur. Erken faz sekresyonundaki azalma bu hastalığın bir parçasıdır ve tüm etnik gruplarda hastalığın başlangıcı sırasında temel patofizyolojik bir değişim olarak son derece önemlidir. Bozulmuş insülin sekresyonu genellikle ilerleyicidir ve onun ilerlemesi glukoz toksisitesini ve lipo-toksisiteyi içerir. Tedavi edilmediğinde ise pankreatik β hücre kütlelerinde bir azalmaya neden olur. Pankreatik β hücre fonksiyonunun bozulmasının ilerlemesi kan glukozunun uzun dönem kontrolünü geniş ölçüde etkiler. Hastalığın

başlangıcından sonra erken evredeki hastalar artmış insülin direnci ve azalmış erken faz sekresyonunun bir sonucu olarak postprandiyal kan glukozunda bir artış gösterirken, pankreatik β hücre fonksiyonunun bozulmasının ilerlemesi sonradan kan glukozunun kalıcı yükselmesine neden olur (33,35).

T2DM fizyopatolojisinde insülin direnci de oldukça önem taşımaktadır. İnsüline karşı azalmış duyarlılık insülin direnci olarak bilinir. Obezite/aşırı kilo (özellikle aşırı viseral adipozite), fazla glukokortikoidler (cushing sendromu veya steroid tedavisi), aşırı büyüme hormonu (akromegali), gebelik, gestasyonel diyabet, polikistik over hastalığı, lipodistrofi, insülin reseptörüne karşı otoantikorlar, insülin reseptörü ve peroksizom proliferatör-aktif reseptör (PPAR)- γ mutasyonları, genetik obeziteye neden olan mutasyonlar (melanokortin reseptör mutasyonları gibi) ve hemokromatoz (doku demir birikimine neden olan kalıtsal bir hastalık) insülin direncinin nedenleri arasındadır (36). Açlık kan insülini, viseral obezite ve hipertrigliseridemi ile ilişkili olan insülin direnci, vücuttaki insülinin kan konsantrasyonu ile orantılı olarak yeterli etki göstermediği bir durumdur. Hastalık başlangıcından önce gelişir ve genişler. Karaciğer ve kas gibi ana hedef organlarda insülin etkisinin bozulması T2DM'nin yaygın bir patofizyolojik özelliği olduğundan insülin etkisinin moleküler mekanizmasının araştırılması insülin direncinin genetik faktörler ve çevresel faktörler (hiperglisemi, serbest yağ asitleri, inflamatuvar mekanizma gibi) ile nasıl ilişkili olduğunun anlaşılması açısından önem taşımaktadır. Bilinen genetik faktörler, sadece insülin sinyallerini doğrudan etkileyen insülin reseptörü ve insülin reseptör substratı (IRS)-1 gen polimorfizmlerini değil aynı zamanda viseral obezite ile ilişkili $\beta 3$ adrenerejik reseptör geni ve ayrıştırıcı protein (UCP) geni gibi genlerin polimorfizmlerini de içerir ve insülin direncini teşvik eder. Ayrıca, bozulmuş insülin sekresyonu, glukolipotoksisite, inflamatuvar mediyatörler ve adiposit türevi biyoaktif maddelerin (adipokinlerin) tutulumu da insülin direnci açısından önemlidir. Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), leptin, resistin ve serbest yağ asitleri direnci arttırmak için hareket ederken, adiponektin direnci iyileştirir. İnsülin direnci (HOMA-IR), insülin duyarlılığı testi (yükleme testi), sabit durum plazma glukozu (SSPG), minimum model analizi ve insülin klamp yöntemleri de insülin direncinin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Matsuda indeksi ise karaciğer ve kaslardaki insülin direncini eşzamanlı olarak değerlendirebilen nispeten basit bir prosedürdür (33,37).

T2DM'nin patogenezinde endokrin pankreas, karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusunun katkısı oldukça önemlidir. T2DM'de kas ve yağ dokusunda insülin direnci, artmış hepatik glukoz üretimi, bozulmuş insülin sekresyonu, bağırsak inkretin hormonlarının azalmış sekresyon ve etkisi ile merkezi sinir sistemi yollarının değişmiş dengesini içeren birçok bozukluk tanımlanmıştır (Şekil 2-4 ve Şekil 2-5) (2,32). İskelet kası insanlarda insüline duyarlı en büyük organdır. Dolayısıyla bu dokudaki insülin direnci, tüm vücut glukoz homeostazı üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. İnsülinin sinyal iletimi olaylarını aktive etme, seçilen aday genlerin ekspresyonunu değiştirme ve kas glikojen sentezini uyarma yeteneği ise yüksek riskli kişilerde bozulmaktadır (38-41). İntramiyoselüler lipid birikimi, kas insülin direncinin bir diğer önemli özelliğidir ve insülin sinyal iletiminin downregülasyonu üzerinden patojenik bir rol oynayabilir (42). Yağ dokusu ise sadece bir enerji biriktirme deposu olarak değil aynı zamanda tüm vücudun metabolik fizyolojisini modüle edebilen kompleks bir aktif endokrin dokusu olarak da tanınmaktadır. İnsanlarda yağ dokusu fazlalığı (obezite) veya eksikliği (lipodistrofi) insülin direnci ve T2DM ile ilişkilidir. Uygunsuz hepatik glukoz üretimi de T2DM'nin önemli bir özelliği olup karaciğer karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında merkezi bir rol oynar. Yakıt kullanılabilirliği sırasında glukozun glikojen olarak depolanması ve açlık dönemleri sırasında amino asitler (glukoneojenez) gibi karbonhidrat olmayan kaynaklardan glukozun sentezi ve glikojenin metabolizması yoluyla glukoz homeostazının korunması için kritik önem taşır. İnsülin, hepatik insülin reseptörlerine bağlanarak, glukoz üretimini inhibe etmek ve gen ekspresyonunu modifiye etmek için insülin sinyal yollarını aktive ederek doğrudan karaciğere etki edebilir (2,43).



Şekil 2-4 (A) ve Şekil 2-5 (B). T2DM'nin patogenezinde dokuların katkısı (2,32)

NEFA: Esterleşmemiş yağ asitleri

T2DM, β -hücre fonksiyonunda ilerleyici bozulma ile karakterizedir. Adacık fonksiyonu tanıda en az %50 oranında azalır. Otopsi çalışmaları, T2DM'li bireylerde β hücre kütlesinin yaklaşık %60 oranında azaldığını göstermiştir. Glukotoksisite, lipotoksisite, proinflamatuvar sitokinler, hiperleptinemi, bozulmuş inkretin sekresyonu ve etkisi ve adacık amiloid birikimini içeren birçok faktör ilerleyici β hücre disfonksiyonuna katkıda bulunabilir (44-46). β hücresi büyümesi ve fonksiyonu insülin, glukoz, glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1), gastrik inhibitör peptid (GIP), inkretin hormonları ve leptini içeren dolaşım faktörleri ile düzenlenir. Postprandiyal GLP-1 yanıtları T2DM'de azalır ve bozulmuş postprandiyal insülin sekresyonuna ve azalmış adacık kütlesine katkıda bulunabilir (46-49).

Diyabet patogenezinde GLP-1'in önemi, GLP-1 agonistleri ve DPP-IV (dipeptidil peptidaz-IV) inhibitörleri ile yapılan tedavi edici başarısı ile vurgulanmıştır (50,51). T2DM'de GIP sekresyonu korunur, ancak fonksiyonel yanıt bozulmuştur (46). Pankreatik α hücreleri, açlık durumunda ve hipoglisemi sırasında salgılanan önemli bir karşı düzenleyici hormon olan glukagonun salgılanması yoluyla diyabet patogenezinin katkıda bulunur (52). Glukagon fazlalığı ise T2DM'nin açlık hiperglisemi özelliğine ve artmış glukoz üretimine katkıda bulunabilir (53). Dolayısıyla, glukagon seviyelerini ve/veya etkisini azaltmak gibi glukagon yollarını hedefleme T2DM'de potansiyel bir

terapötik müdahale olabilir (54). GLP-1 agonistleri (exenatid), DPP-IV inhibitörleri (örneğin sitagliptin) ve amilin analogu pramlintid glukagon sekresyonunu azaltarak terapötik etkinliğe katkıda bulunabilir (50,51).

2.2. SİRTUİN GEN AİLESİ

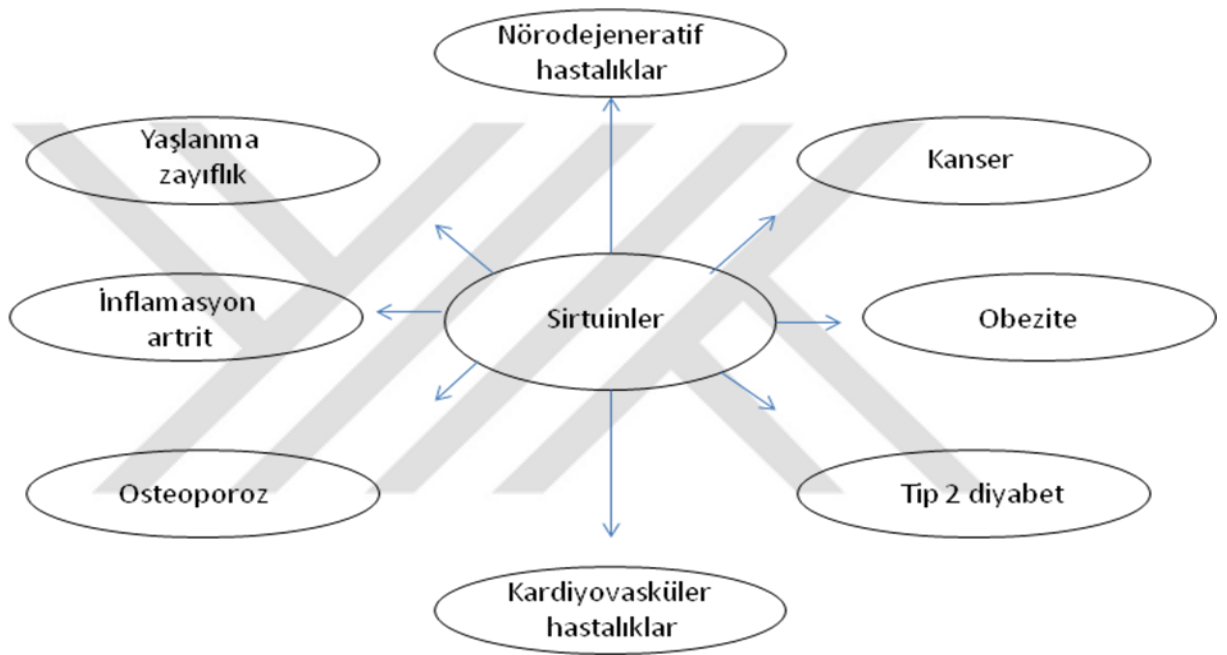
Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) bağımlı olarak görev yapan Sirtuin (SIRT) ailesine ait genler ilk olarak mayada ve daha sonra bakterilerde, sineklerde, solucanlarda, bitkilerde ve memelilerde tanımlanmıştır. NAD^+ bağımlı deasetilaz ve/veya adenosin difosfat (ADP)-ribozil transferaz aktiviteleri bulunan SIRT genlerinin memelilerde 7 varyantı (SIRT1-SIRT7) bulunmaktadır ve bu genler SIRT enzimlerini eksprese etmektedirler. SIRT1, SIRT2, SIRT3 ve SIRT7'nin deasetilaz aktiviteleri bulunmaktadır. SIRT4'ün sadece ADP-ribozil transferaz aktivitesi bulunurken SIRT6 deasetilaz ve ADP-ribozil transferaz olarak işlev görmektedir. SIRT5 ise zayıf bir deasetilaz aktivitesine sahip olmakta birlikte demalonilaz, desüksinilaz ve deaçilaz olarak görev yapmaktadır. SIRT ailesine ait 7 gen arasında en dayanıklı deasetilaz aktivitesine sahip olan gen ise SIRT1'dir (Tablo 2-6) (6,8-12,55-57).

SIRT enzimlerinin iki merkezi bölgesinin olduğu ve bunların NAD^+ bağımlı katalitik aktivite gösteren histidin rezidülerinden oluştuğu tanımlanmıştır. Sirtuinler arasındaki farklılık NAD^+ bağımlı katalitik temel alanı saran N-terminal ve C-terminal zincirlerin boylarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Merkezdeki histidin rezidüsü ise enzimatik bir merkez olarak işlev görmektedir. Memeli SIRT genleri arasında hücrel lokalizasyon açısından da fark bulunmaktadır. SIRT1 çekirdek ve sitoplazmada, SIRT2 sitoplazmada, SIRT3 çekirdek ve mitokondriyal matrikste, SIRT4 mitokondride, SIRT5 mitokondri ve sitoplazmada, SIRT6 çekirdek ve endoplazmik retikulumda ve SIRT7 ise çekirdekçik ve çekirdekte lokalize olmaktadır. Çekirdekte SIRT1 ökromatin ile ve SIRT6 ise heterokromatin ile bağlantılıdır. SIRT1, insülin sinyalizasyonunun inhibisyonu gibi sitoplazmik hedeflere müdahale edilmesi gerektiğinde ise sitoplazmaya geçerek görev yapmaktadır (Tablo 2-6) (6,10-13,56-61).

Tablo 2-6. Sirtuin genlerinin özellikleri (6,12,56,57)

Sirtuinler	SIRT1	SIRT2	SIRT3	SIRT4	SIRT5	SIRT6	SIRT7
Sınıflandırma	Sınıf Ia	Sınıf Ib	Sınıf Ib	Sınıf II	Sınıf III	Sınıf IVa	Sınıf IVb
Hücresel lokalizasyon	Çekirdek ve sitoplazma	Sitoplazma (çekirdek)	Çekirdek ve mitokondriyal matris	Mitokondri	Mitokondri ve sitoplazma	Çekirdek ve endoplazmik retikulum	Çekirdek ve çekirdekçik
Enzimatik aktivite	Deasetilaz	Deasetilaz	Deasetilaz	ADP-ribozil transferaz	Deasetilaz Demamonilaz Desüksinilaz Deaçilaz	Deasetilaz ADP-ribozil transferaz	Deasetilaz
Ekspresyon	Yağ dokusu, kalp, böbrek, karaciğer, retina, iskelet kası, damarlar	Yağ dokusu, beyin, kalp, böbrek, karaciğer, iskelet kası, damarlar	Yağ dokusu, beyin, kalp, böbrek, karaciğer, oositler, iskelet kası, damarlar	Beyin, kalp, böbrek, karaciğer, damarlar	Kalp, karaciğer, damarlar, timus, beyin, böbrek	Beyin, kalp, karaciğer, retina, iskelet kasları, timus, damarlar, böbrek, testis, iskelet kası	Kalp, damarlar, karaciğer, beyin, iskelet kası
Düzenleyici işlevler	Metabolizma, inflamasyon	Hücre döngüsü ve mitotik, miyelinasyon	Yağlı asit oksidasyonu, antioksidan savunmaları	Amino asit ile uyartılan insülin sekresyonu, yağ asidi oksidasyonunun baskılanması	Ür döngüsü	Genom kararlılığı, metabolizma	Ribozomal DNA transkripsiyonu
Hedefler	FOXO1, FOXO3, pGC-1 α , p53, NF- κ B, Notch, HIF1 α , LXR, FXR, SREBP1c, vb	FOXO1, FOXO3, PEPCK, tubulin, PAR-3	OXPHOS complexes, SOD2, LCAD, HMGCS2, GDH, IDH2, PIP2, ACADL, FOXO3, ACS2, OTC, GLUD1, NDUFA9, SDHA, ATP5A1, ALDH2, MRPL10, STEK11, HISTH3, XRCC6	GDH	CPS1	H3K9, H3K56	

SIRT genleri karaciğer, akciğer, bağırsak, pankreas, kas, beyin ve yağ doku gibi birçok organ ve dokuda eksprese olmakta olup yaşlanma, DNA onarımı, gelişim ve üreme, gen ifadesinin düzenlenmesi, apoptoz, lipid ve glukoz metabolizması, nörodejenerasyon ve inflamasyon gibi birçok hücresel işlevde önemli rol oynamaktadır (10,12,15,57,62-65). SIRT genlerinin obezite, tip 2 diyabet, kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok bozuklukla ilişkisi bulunmaktadır (Şekil 2-6) (12,57,64).



Şekil 2-6. Sirtuinler ve ilişkili hastalıklar (12,57,64)

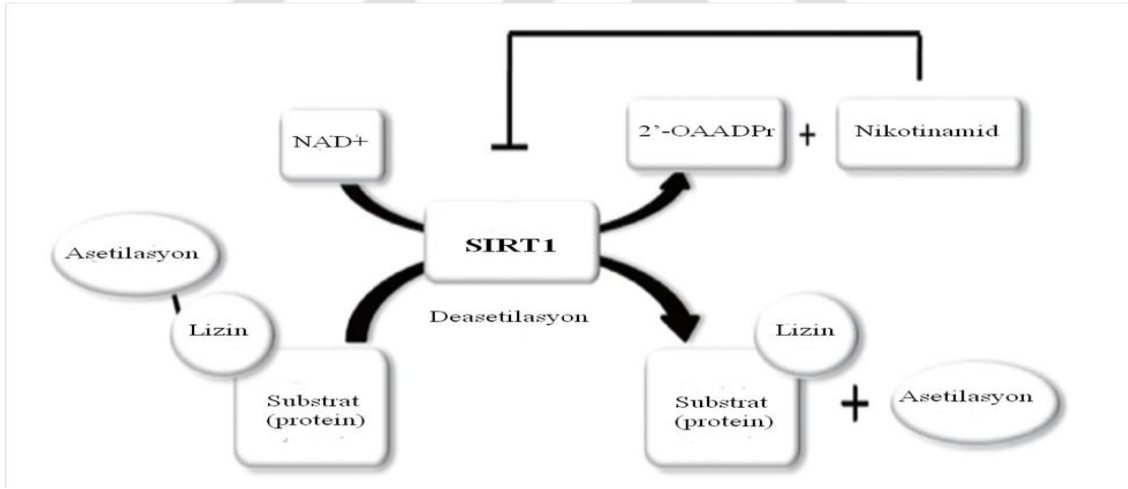
2.3. SİRTUİN 1 (SIRT1), İŞLEVLERİ, TİP 2 DİYABETTEKİ ROLÜ

2.3.1. SIRT1 Geni, Hücresel Lokalizasyonu ve Enzimatik Aktivitesi

Sirtuin 1 (SIRT1) proteini, sirtuin sistemine dahil olan bir protein olup ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de daha sonra *Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans*'da tanımlanmıştır. Bu organizmalarda Sir2 (Silent Mating Type Information Regulation-2) olarak adlandırılmış ve Sir2 hayat süresi ve yaşlanma ile ilişkilendirilmiştir. Daha sonra memelilerde tanımlanan bu gen *SIRT1* geni olarak adlandırılmıştır. *SIRT1* geni 10. kromozomun uzun kolunda lokalizedir (10q21.3) ve 11 ekzon içermektedir. (Pubmed,13).

Posttranslasyonel modifikasyonlardaki asetilasyon ve deasetilasyon arasındaki dengeyi sağlamaya yardımcı olan SIRT1 proteini sınıf I histon deasetilaz olarak görev yapmaktadır (Pubmed,13). Ayrıca, SIRT1 aktivitesi posttranskripsiyonel aşamada fosforilasyon ve defosforilasyon olayları ile değişkenlik gösterebilmektedir. Fosforilasyon ile (kinazlar gibi) SIRT1 aktivitesinde artma ve defosforilasyon ile SIRT1 aktivitesinde azalma meydana gelmektedir (66,67).

Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) bağımlı deasetilaz olarak görev yapan SIRT1, hedef proteini lizin rezidüsünden deasetile eder. NAD^+ ve hedef proteinin asetil-lizin rezidüsüne bağlanır. Asetil-lizin rezidüsünden asetil grubunu NAD 'ın ADP-riboz kısmına transfer eder. Böylece NAD 'ı koenzim olarak kullanan SIRT1, hedef proteini deasetile etmiş olur. Bu reaksiyon sonucunda enzimatik ürünler olarak lizin, 2'-O-asetil-ADP-riboz ve nikotinamid üretilir. Nikotinamid, SIRT1'in negatif geri bildirim inhibitörü olarak görev yapar. NAD ile yarışan nikotinamid SIRT1'in koenzim bağlama bölgesine bağlanırsa SIRT1'i inhibe eder (Şekil 2-7) (68,14).



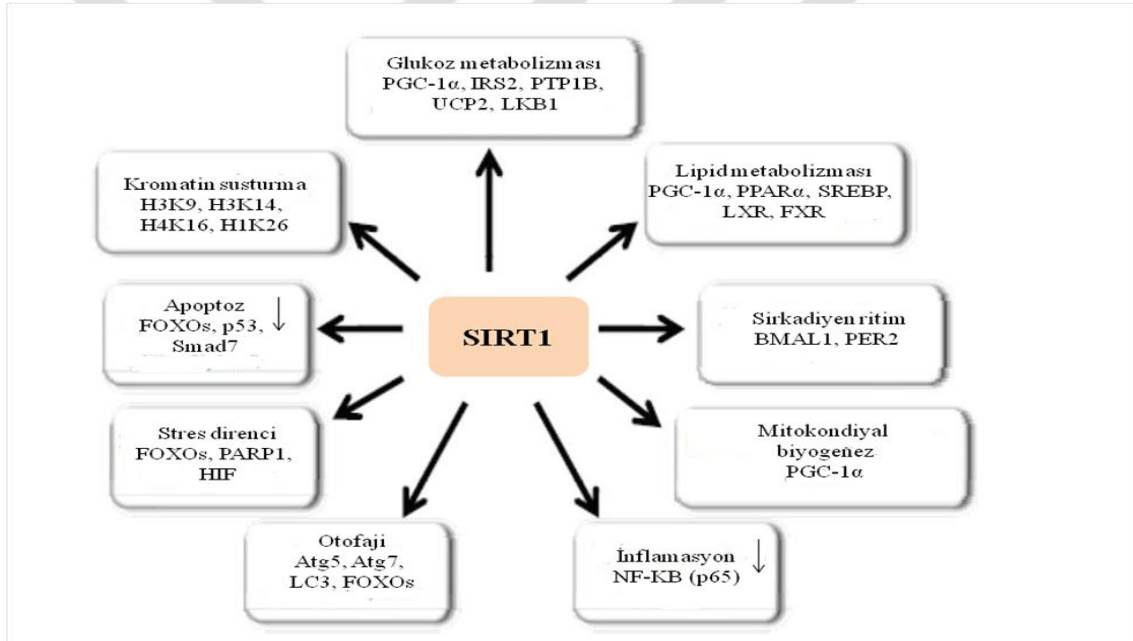
Şekil 2-7. SIRT1'in enzimatik aktiviteleri (14)

SIRT1: Sirtuin 1, NAD^+ : Nikotinamid adenin dinükleotid, 2'-OAADPr: 2'-O-asetil-ADP-riboz

NAD bağımlı deasetilaz olan SIRT1 hücrede çekirdek ve sitoplazmada lokalize olmaktadır. Ayrıca SIRT1 proteini beyin (özellikle hipotalamus), kalp, böbrek, karaciğer, pankreas, iskelet kası, dalak, endotel ve beyaz yağ dokuda bol miktarda sentezlenmektedir (13,69-71). Kalori kısıtlaması (72), egzersiz (73), kırmızı şarap (74), resveratrol (75), kuersetin (76) ve proantosiyanidin (77) gibi bitkisel içerikler SIRT1'i aktive ederken sigara, soğuğa maruz kalma (78), melatonin (79), nikotinamid (80) ve oksidatif stres gibi faktörler SIRT1'i inhibe etmektedir.

2.3.2. SIRT1 Geni ve İşlevleri

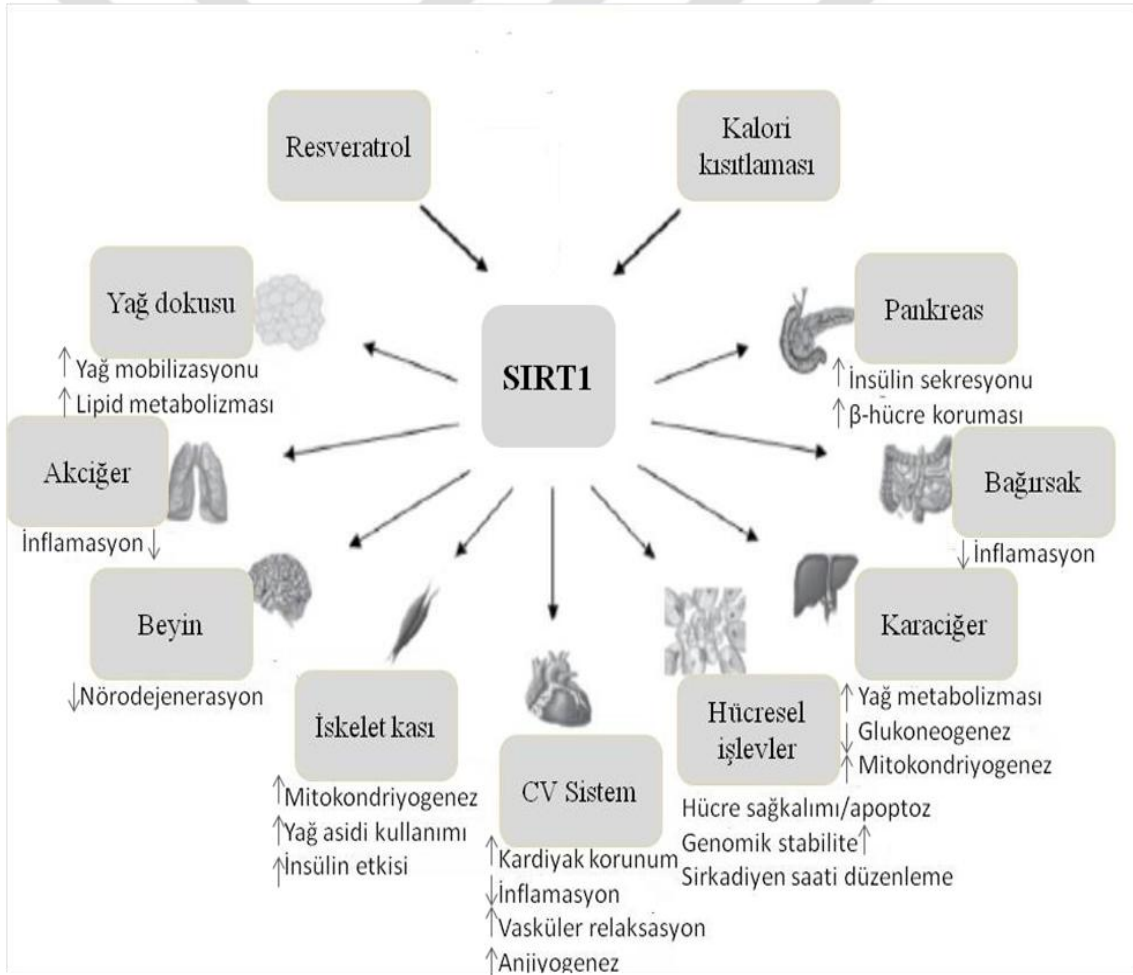
Biyolojik sistemde SIRT1 oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Transkripsiyon faktörü ve kofaktör olarak görev yapan SIRT1 proteini gen ifadesinin düzenlenmesini ve kromatin şekillenmesini sağlamaktadır (10,81). SIRT1, histonları deasetile ederek kromatinin yoğunlaşmasına ve gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olur. Bu modifikasyonlar organizmanın sağlığı ve ömür uzunluğu ile ilişkilendirilmiştir. SIRT1 gen ifadesinin düzenlenmesinin yanında glukoz ve lipid metabolizması, mitokondriyal biyogenez, inflamasyon, otofaji, sirkadiyen ritim, apoptoz, stres direnci, DNA onarımı, rekombinasyon, yaşlanmanın regülasyonu, transkripsiyon faktörlerinin uyarılması ve hücre homeostazı gibi birçok hücresel fonksiyonu da düzenlemektedir (Şekil 2-8) (6,10,62-65,82,83).



Şekil 2-8. SIRT1'in biyolojik fonksiyonları (6)

PGC-1α: Peroksizom proliferatör-aktif reseptör gamma koaktivatör-1α, IRS2: İnsülin reseptör substratı 2, PTP1B: Tirozin fosfataz 1B, UCP2: Ayrıştırma proteini geni 2, LKB1: Karaciğer kinaz B1, PPAR-α: Peroksizom proliferatör-aktif reseptör-α, SREBP: Sterol düzenleyici element bağlama proteini, LXR: Karaciğer X reseptörü, FXR: Farnesoid X reseptörü, BMAL1: Beyin ve kas aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator benzeri 1, PER2: Periyod 2, NF-κB: Nükleer faktör-κB, Atg: Otofajiyle ilişkili gen, LC3: Hafif zincir 3, FOXO: Forkhead box class O, PARP1: Poli (ADP-riboz) polimeraz-1, HIF: Hipoksiyle indüklenen faktör, p53: Tümör protein 53

SIRT1 pankreasta insülin üretimi, iskelet kasında yağ asidi üretiminin düzenlenmesi (84,85), beyinde nörodejenerasyon ve nöronal hücre sağkalımı (86), akciğer ve kalpte inflamasyon ve kardiyoprotektin ile ilişkili bir protein (87) olup adiponektin ve tümör nekroz faktörün düzenlenmesinde de görev yapmaktadır (88). Pankreasta insülin sekresyonunu ve β hücrelerinin korunmasını artırır, bağırsak ve akciğerde inflamasyonu azaltır, yağ dokuda lipid ve yağ metabolizmasını artırır, beyinde nörodejenerasyonu azaltır, iskelet kasında mitokondri oluşumunu, yağ asidi kullanımını ve insülin etkisini artırır, karaciğerde yağ metabolizmasını ve mitokondri oluşumunu artırırken glukoneogenezi azaltır, kardiyovasküler sistem ile ilgili olarak kardiyak korunumu, vasküler gevşemeyi ve anjiyogenezi artırırken inflamasyonu azaltır, genomik stabiliteyi artırır ve sirkadiyen saati regüle eder (Şekil 2-9) (15).



Şekil 2-9. SIRT1'in ilişkili olduğu dokulardaki işlevleri (15)

CV: Kardiyovasküler

SIRT1, metabolik aktivitenin kontrolünde oldukça önemli bir rol oynar. Çeşitli transkripsiyonel düzenleyiciler de dahil olmak üzere hedef proteinlerin deasetilasyonu yoluyla memeli hücrelerindeki çeşitli biyolojik süreçleri düzenler ve böylece sistemik metabolizmanın kontrolüne katılır. SIRT1'in aktivasyonu birçok hedef proteini etkiler ve modifiye eder (15,89). Kolesterol ve yağ metabolizması ve aynı zamanda glukoz homeostazında oldukça önemli olan SIRT1, kas içerisinde peroksizom proliferatör-aktive reseptör gamma koaktivatör-1 α (PGC-1 α) üzerinden yağ asidi oksidasyonunu ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu, karaciğerde PGC-1 α ve Forkhead box class O1 (FOXO1) üzerinden glukoneogenezi ve yağ asidi oksidasyonunu ve pankreasta ise UCP-2 üzerinden insülin sekresyonunu artırır. PPAR- γ ve karaciğer X reseptörü (LXR) üzerinden lipid ve yağ metabolizması üzerine etkide bulunur. PPAR- α , LXR ve farnesoid X reseptörü (FXR) gibi nükleer reseptörlerin aktivasyonu yoluyla ve sterol düzenleyici element bağlama proteininin (SREBP) negatif regülasyonu üzerinden lipid metabolizmasına etki eder, karaciğer yağlanmasına karşı koruyucu bir etki gösterir. FXR ve LXR'yi uyararak safra asidi üretimini ve geri kolesterol transportunu artırırken, lipojenik ve kolesteroljenik genlerin ekspresyonunu azaltır (14,89-91). Endotelial nitrik oksit sentazın (eNOS) artmasına ve dolayısıyla endotelial yaşlanmanın azalmasına yol açar (92). Endotel hücrelerin anjiyogenik aktivitesinde, damarların oluşumunda ve büyümesinde görev alır (87). Beyin ve kas aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator benzeri 1 (BMAL1) ve periyod 2 (PER2) gibi sirkadiyen saatin bileşenlerini düzenler. Tümör protein 53 (p53), poli-ADP-riboz polimeraz-1, hipoksi indüklenebilir faktörler (HIF-1 α ve HIF-2 α), nükleer faktör (NF)- κ B, otofajiyle ilişkili gen (Atg)5, Atg7 ve hafif zincir 3 (LC3) gibi transkripsiyon faktörlerini deasetile eder. NF- κ B, p53, p73, E2F1, Ku70 ve FOXO3 üzerinden inflamatuvar cevabı ve apoptozu azaltırken DNA tamiri, oksidatif stres direnci ve ilaç akışını artırır. Bu fonksiyonlar çevresel toksisiteye fizyolojik yanıt olarak stres direnci, hipoksi, apoptoz, inflamatuvar sinyalizasyon ve otofajiye aracılık ederler. Böylece, SIRT1 aktivasyonu indirgenmiş apoptoza, artmış mitokondriyal biyogeneze, inflamasyonun inhibisyonuna, glukoz ve lipid metabolizması ile sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesine ve gen susturma ile otofajinin indüksiyonuna neden olabilir (Tablo 2-7) (14,15,89-91).

Tablo 2-7. SIRT1 hedefleri/bağlanma partnerleri ve SIRT1 ekspresyonunun etkileri (15)

SIRT1 hedefleri ve bağlanma partnerleri	SIRT1 etkisinin önemi
p53*	Apoptozu önleme veya indüklenme, oksidatif strese karşı direnci kontrol etme
FOXO1* FOXO3a* FOXO4*	Hücre katabolizma, hücre büyümesi, proliferasyon, farklılaşma, yenilenme, immün yanıt ve apoptoz ile ilgili genlerin düzenlenmesi, otofajik aktiviteleri artırma, inflamasyonu önleme, oksidatif stres direncini kontrol etme
PGC-1 α *	Glukoneogenez, mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu ve mitokondriyal biyogenez için gen ekspresyonunun indüksiyonu
NF- κ B*	Pro-inflamatuvar genlerin bastırılması, aşırı iltihaplanmayı önleme
HIF1 α *	Transkripsiyonel aktivitenin baskılanması
HIF2 α *	Transkripsiyonel aktivitenin etkinleştirilmesi, eritropoietini artırma
Histon 1* Histon 2* Histon 3*	Kromatin oluşumu ve stabilitesi üzerindeki etkiler, kromatin yeniden şekillendirilmesi, DNA onarımı, genomik stabilite, hücre uzun ömürlülük
Cortactin*	Kanser hücresi hareketliliğini ve göçünü geciktirme
Ku70*	DNA onarım etkinliğini teşvik etme, hücre sağkalımını artırma
PPAR γ †	Yağ depolama ile ilgili genlerin bastırılması = lipogenezin azaltılması/lipolizin aktivasyonu
PPAR α †	Yağ asidi alımı ve oksidasyonunda rol alan genlerin indüksiyonu, karaciğerde glikolizin bastırılması
UCP2†	Pankreatik beta hücrelerinin insülin salgılama yeteneğini iyileştirme, pankreatik fonksiyonu iyileştirme
eNOS*	Kan damarı gevşemesini teşvik ederek arterlerde ROS/RNS üretimini ve inflamasyonu önleme, endotelial ve kardiyovasküler fonksiyonun iyileştirilmesi, damarların korunumu

LXR*	Trigliseridlerin, total kolesterolün ve LDL-kolesterolün azaltılması, HDL-kolesterolün arttırılması, kardiyovasküler hastalığa karşı koruma
SREBP1*	Karaciğerde hepatik trigliserid sentezinin ve yağ birikiminin azaltılması, non alkolik yağlı karaciğer hastalığına karşı koruma
Atg5* Atg7* Atg8*	Hasar gören hücresel bileşenlerin bozulması ve geri kazanımı, hücresel iyileştirmeyi teşvik etme
Saat‡	Sirkadiyen ritmin düzenlenmesi
c-Myc*	Hücre büyümesi ve transformasyonun negatif regülasyonu, tümör baskılama
TORC1/ CREB*	Huntington hastalığının patogenezinde nöroprotektif rol
PCAF*	E2F1/p73 apoptotik yolağını kontrol etme, tümör hücresi sağkalımı ve kemoterapi duyarlılığını modüle etme

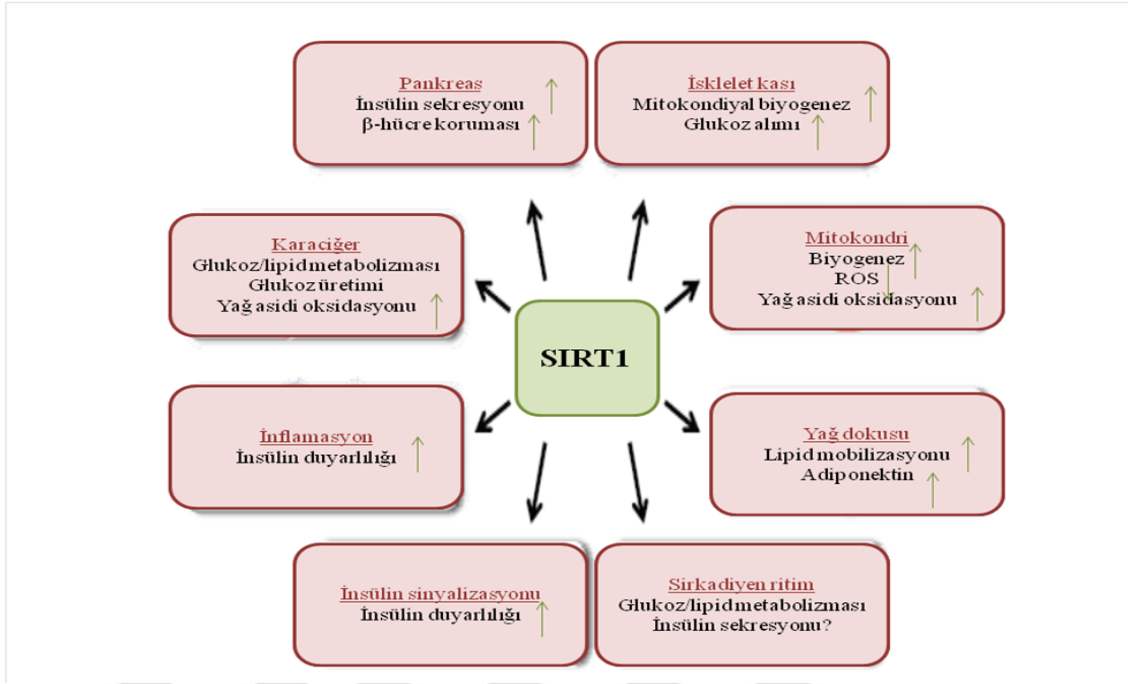
*Deasetilasyon hedefleri, †Transkripsiyonel hedefler, ‡Bağlanma partnerleri

FOXO: Forkhead box class O, PGC-1 α : Peroksizom proliferatör-aktif reseptör gamma koaktivatör-1 α , NF- κ B: Nükleer faktör- κ B, HIF: Hipoksiyle indüklenen faktör, PPAR: Peroksizom proliferatör-aktif reseptör, UCP2: Ayrıştırma proteini geni 2, eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz, LXR: Karaciğer X reseptörü, SREBP1: Sterol düzenleyici element bağlama proteini1, Atg: Otofajiyle ilişkili proteinler, TORC1: Düzenlenen CREB 1 transdüseri, CREB: cAMP cevap elementi bağlayıcı protein, PCAF: P300/CBP ile ilişkili faktör

2.3.3. T2DM'nin Patogenezinde SIRT1'in Rolü

Pankreatik β hücrelerindeki bozukluklar ve insülin direnci T2DM'nin patogenezinde yer alan en önemli özelliklerdir. İnsülin üreten β hücreleri artmış insülin direncini telafi edemediği zaman glukoz homeostazı bozulur ve sonuçta T2DM gelişir (6).

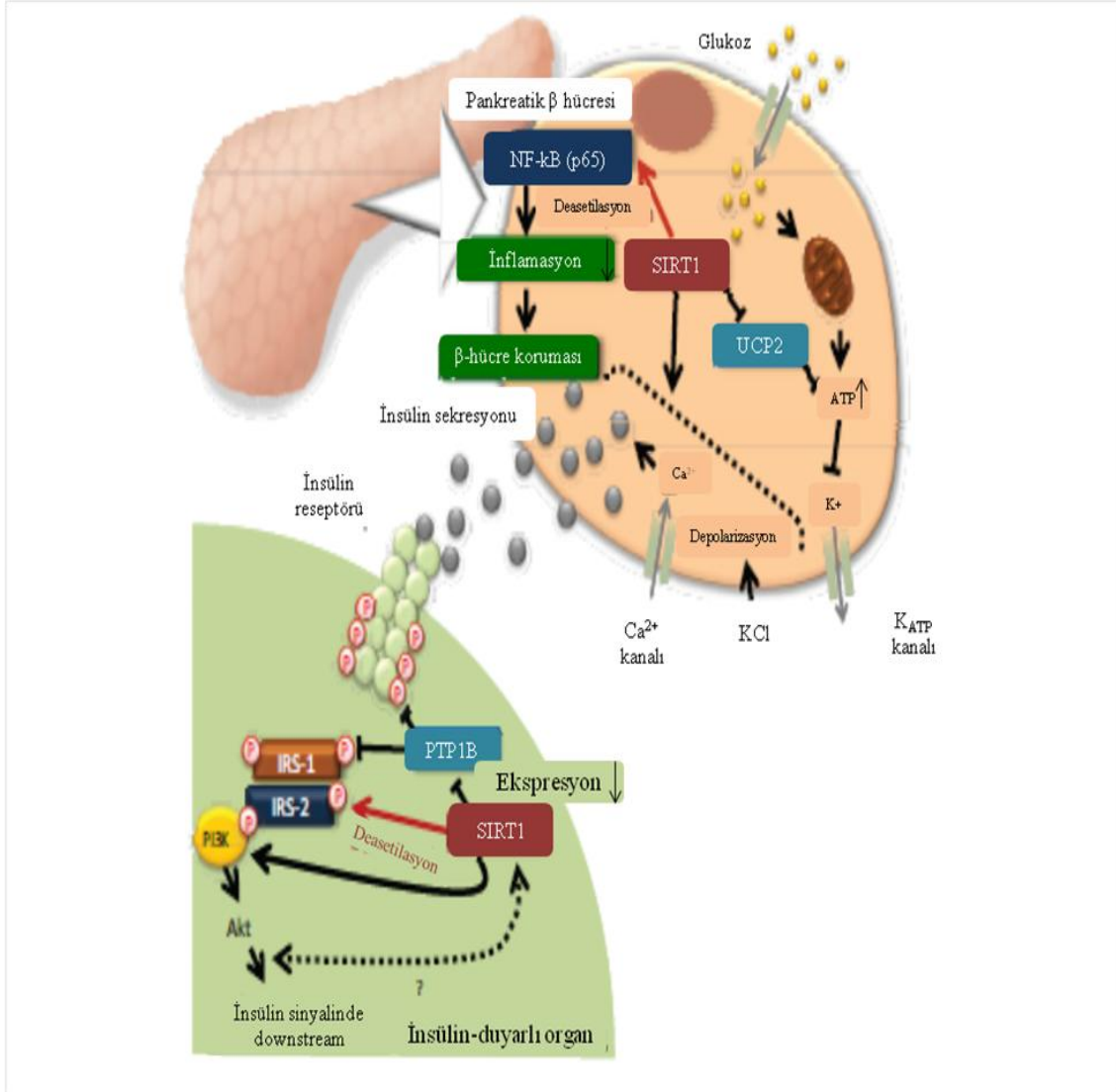
SIRT1, glukoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde görev yapan bir sirtuindir. Pankreasta β hücrelerinin korunmasını ve insülin salgılanmasını, karaciğerde glukoneogenezi ve yağ asidi oksidasyonunu, yağ dokuda lipid mobilizasyonunu ve iskelet kasında ise mitokondriyal biyogenezi ve glukoz alımını arttırır. Mitokondride reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini azaltırken biyogenezi ve yağ asidi oksidasyonunu düzenler (Şekil 2-10) (6,14,15).



Şekil 2-10. Tip 2 diyabetin patogeneğinde SIRT1'in etkisi (6)

2.3.3.1. SIRT1'in insülin salgılanması ve sinyalizasyonundaki rolü

SIRT1'in aşırı üretilmesi UCP-2'yi baskılayarak adenosin trifosfat (ATP) üretimini artırır. Bu durum hücre zarı depolarizasyonuna ve Ca^{+2} bağımlı insülin ekzositozuna yol açar. SIRT1, pankreasta UCP-2 üzerinden insülin salgılanmasını artırırken aynı zamanda NF- κ B (p65)'yi deasetile ederek inflamasyonu azaltır ve β hücre korunumunu artırır (6,15,85,89). İnsüline duyarlı organlarda IRS-1 ve insülin reseptörü üzerindeki tirozin rezidülerinin defosforilasyonu yoluyla iskelet kasında insülin sinyalizasyonunun negatif bir düzenleyicisi olarak görev yapan tirozin fosfataz (PTP) 1B'nin ekspresyonunu baskılar. Deasetilasyon yoluyla IRS-2'nin insülin kaynaklı tirozin fosforilasyonunu düzenler. IRS-2 tirozin rezidülerinin fosforilasyonunun devam etmesi insülin ile aktive edilmiş SIRT1 tarafından IRS-2'deki asetillenmiş lizin rezidülerinin uzaklaştırılmasını gerektirir. Fosforile IRS-2 ise insülin sinyalini Akt gibi hedeflere vermek için bir adaptör protein olarak işlev görür. Böylece insüline duyarlı organlarda SIRT1 PTP1B ekspresyonunu baskılayarak, IRS-2'yi deasetile ederek ve Akt yolağının aktivasyonunu sağlayarak insülin sinyalizasyonunu pozitif olarak düzenler (Şekil 2-11) (6,93,94).



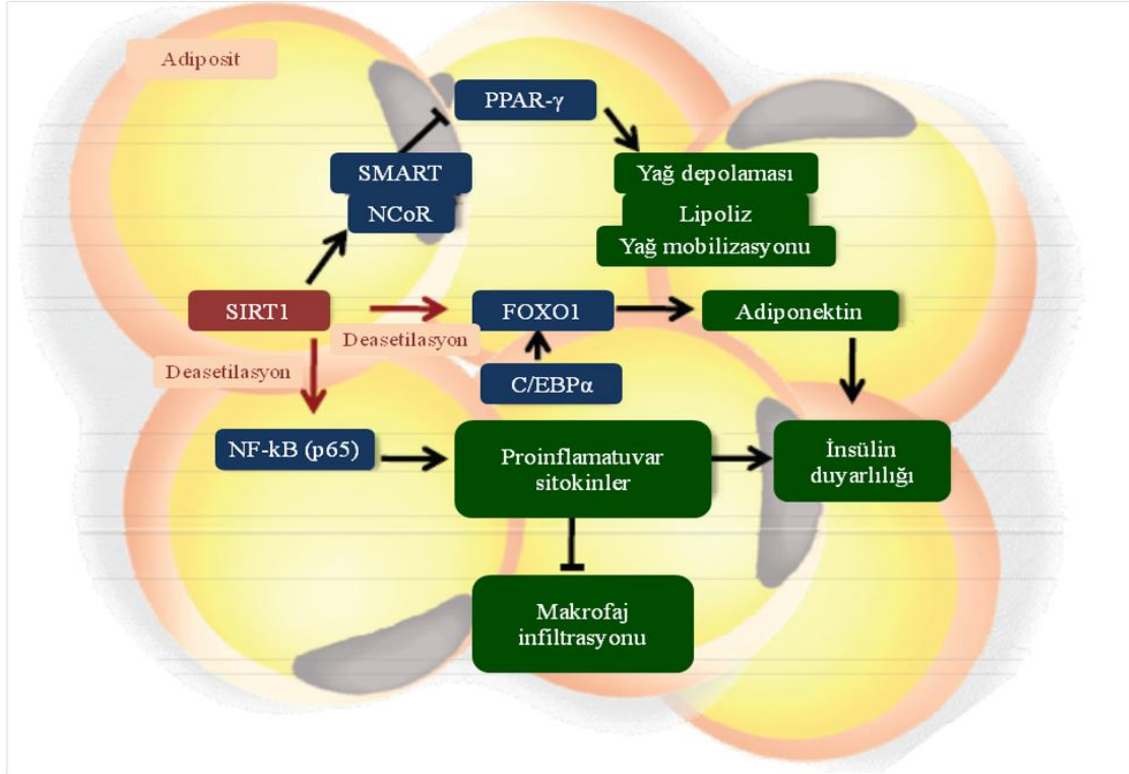
Şekil 2-11. SIRT1’in insülin salgılanması, β hücrelerinin korunması ve insülin sinyalizasyonundaki etkisi (6)

SIRT1: Sirtuin 1, ATP: Adenosin trifosfat, UCP-2: Ayrıştırma proteini geni 2, NF-κB: Nükleer faktör-Kb, Ca: Kalsiyum, KCl: Potasyum klorür, P: Fosfor, PTP1B: Tirozin fosfat 1B, PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz, Akt: Protein kinaz B, IRS: İnsülin reseptör substratı

2.3.3.2. SIRT1’in yağ dokudaki rolü

Adipositler lipid depolarlar ve adipokin üretirler, bu nedenle T2DM patofizyolojisinde oldukça önemlidirler. PPAR-γ yağ asidi depolama ve glukoz metabolizmasında rol oynayan bir protein olup beyaz yağ hücrelerinde serbest yağ asidi alımı ve trigliserid sentezinde yer alan genlerin indüksiyonunu düzenler ve böylece lipid depolama kapasitesini artırır. SIRT1, nükleer reseptör korepresör (NCoR) ve retinoid ve tiroid hormon reseptörleri susturma aracı (SMRT) üzerinden PPAR-γ’nın

transkripsiyonel aktivitesini baskılar. Bu durum yağ mobilizasyonunun ve lipolizin artmasına yol açarken yağ depolanmasının azalmasına neden olur. Ayrıca, SIRT1 yağ dokuda FOXO1'i deasetile ederek adipositlerde anti-diyabetik bir adipokin olan adiponektinin üretilmesine ve NF- κ B'yi deasetile ederek ise proinflamatuar sitokinlerin baskılanmasına yol açarak insülin duyarlılığını artırır (Şekil 2-12) (6,84,88,95).



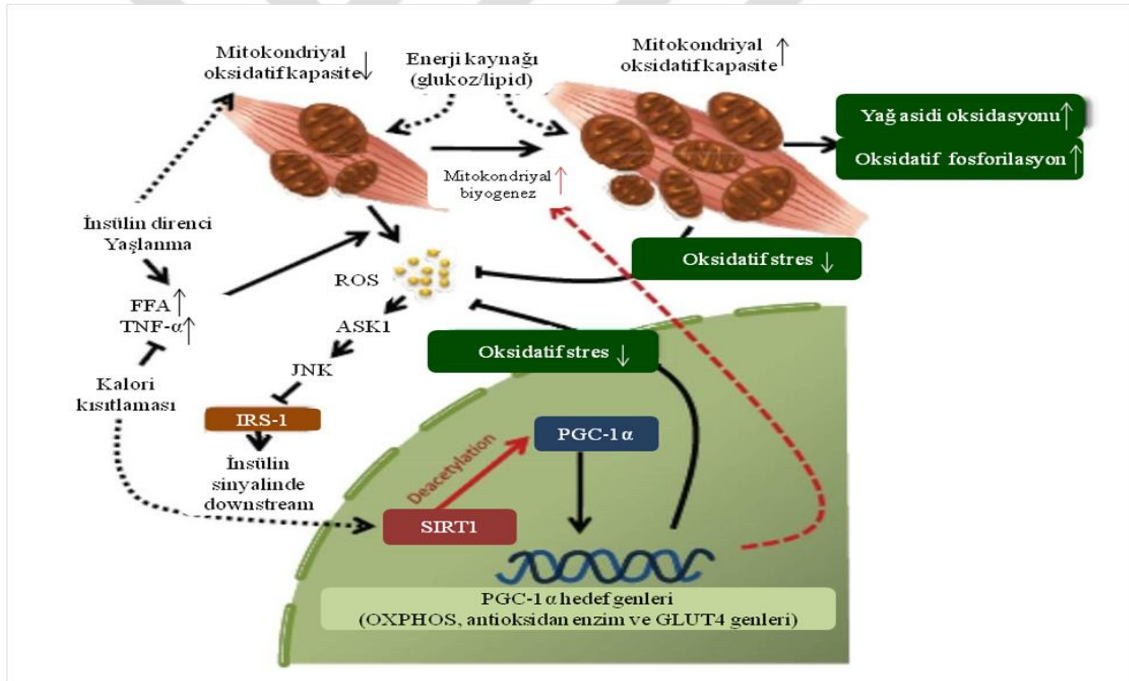
Şekil 2-12. SIRT1'in yağ dokudaki etkisi (6)

SIRT1: Sirtuin 1, PPAR- γ : Peroksizom proliferatör-aktif reseptör- γ , FOXO1: Forkhead box class O1, NF- κ B: Nükleer faktör-Kb, NCoR: Nükleer reseptör korepresör, SMRT: Retinoid ve tiroid hormon reseptörleri susturma aracı, C/EBP α : CCAAT/Hızlandırıcı Bağlayıcı Protein

2.3.3.3. SIRT1'in iskelet kasındaki rolü

SIRT1, mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesi yoluyla glukoz/lipid metabolizması ve insülin direncini etkileyebilir. Besin yetersizliği durumunda yağ asidi oksidasyonunda artış söz konusu olur. Mitokondriyal disfonksiyon nedeniyle azalmış beta oksidasyondan dolayı yağ açıl CoA ve diaçilgliseroldeki artış, iskelet kas hücrelerinde protein kinaz C gibi serin/treonin kinazları aktive eder. Aktive edilmiş kinazlar, IRS-1 üzerindeki serin rezidülerini fosforile ederler ve böylece insülin sinyal yolağı engellenir (6,96). Mitokondrideki oksidatif süreçte önemli bir bileşen olan PGC-

1 α 'nın iskelet kasındaki aktivasyonu ise mitokondriyal oksidatif fosforilasyona (OXPHOS) bağlanmış yağ asitlerinin etkin β -oksidasyonuna yol açar. SIRT1 PGC-1 α üzerinden kas liflerinde oksijen tüketimini artırır ve OXPHOS genleri ile mitokondriyal biyogenezi indükler. Ayrıca, PGC-1 α deasetilasyonu yoluyla PPAR- α aktivasyonunu düzenler. Böylece iskelet kasında PGC-1 α üzerinden yağ asidi oksidasyonunu, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu ve biyogenezi arttırarak insülin direncini regüle eder. İnsülin direnci veya yaşlanma gibi koşullarda mitokondriyal oksidatif kapasite azalır ve bu durum mitokondride ROS'ların oluşumuna neden olur. TNF- α ve serbest yağ asitleri mitokondriden ROS üretimini uyarır ve artmış ROS seviyeleri insülin sinyalinin inhibisyonuna yol açar. SIRT1 ise mitokondriye bağlı ROS üretimini inhibe edebilen anti-oksidatif enzimlerin indüksiyonunu aktive eder (Şekil 2-13) (6,15,89,97).



Şekil 2-13. SIRT1'in iskelet kasındaki etkisi (6)

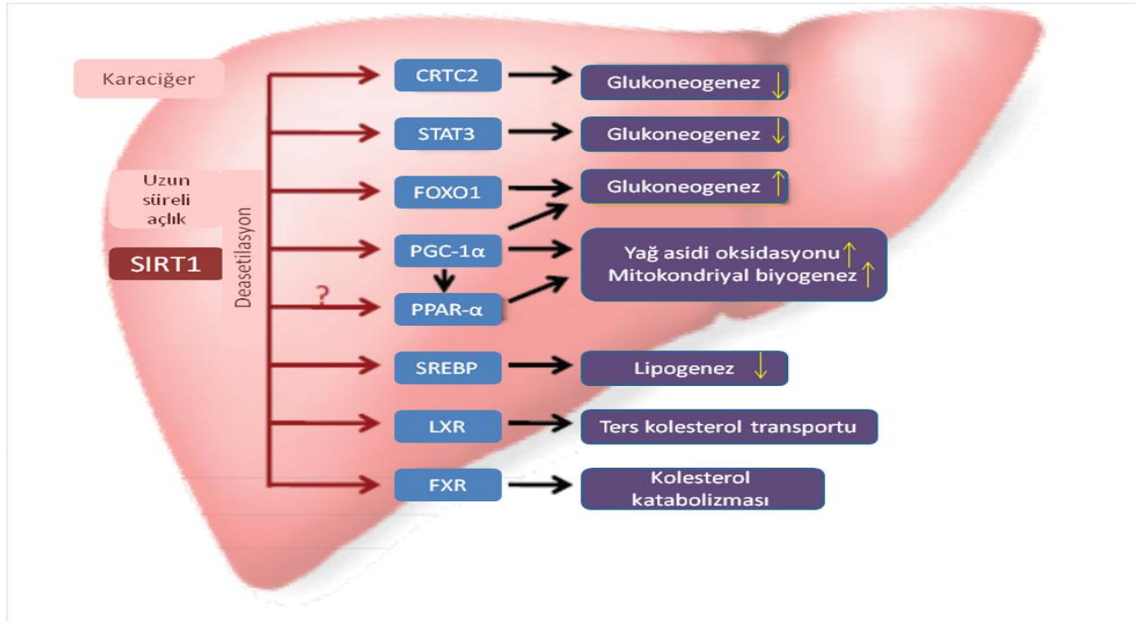
ROS: Reaktif oksijen türleri, FFA: Serbest yağ asidi, TNF- α : Tümör nekroz faktörü- α , IRS-1: İnsülin reseptör substratı-1, SIRT1: Sirtuin 1, PGC-1 α : Peroksizom proliferatör-aktive reseptör gamma koaktivatör-1 α , ASK1: Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1, JNK: c-Jun N-terminal kinaz, GLUT4: Tip 4 glukoz taşıyıcı, OXPHOS: Oksidatif fosforilasyon

2.3.3.4. SIRT1'in karaciğerdeki rolü

Karaciğer, besin ve hormonal sinyallere yanıt olarak glukoz ve lipid metabolizmasında oldukça önemli bir organdır. Karaciğer tarafından glukoz üretimi kompleks bir transkripsiyonel regülatör ağı aracılığıyla kontrol edilir. SIRT1 ise farklı koşullar altında karaciğer glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde karmaşık bir role sahiptir. Açlık durumunda enerji dengesini sürdürebilmek için hepatik glukoz çıkışı ve yağ asidi oksidasyonunda artış olur. Açlığın erken evrelerinde glukagon hormonu, vücut için gerekli glukozu sağlayan glukoneogenez ile ilgili genlerin ekspresyonunu yönlendiren cAMP cevap elementi bağlayıcı protein (CREB) ve CREB-regüle edilmiş transkripsiyon koaktivatör2 (CRTC2) genlerini uyarır (6,98,99). Açlığın geç evrelerinde ise SIRT1 aktive edilir ve etkinleştirilen SIRT1 glukagonun etkilerini azaltmak için CRTC2'yi deasetile eder (100). Deasetilasyon ile PGC-1 α ve FOXO1'i aktive ederek glukoneogenez ile ilgili genleri uyarır ve böylece glukoneogenez arttırır (89). Ayrıca, sinyal transduserleri ve transkripsiyon aktivatörlerinin (STAT3) deasetilasyonu yoluyla da glukoneogenez düzenler. STAT3, glukoneogenez ile ilgili gen ekspresyonunun transkripsiyonel aktivitesini inhibe ederek glukoneogenez baskılar. SIRT1 ise STAT3'ü deasetile eder ve bu durum STAT3 aktivitesinde bir azalmaya ve glukoneogenezin inhibisyonuna neden olur. Buna bağlı olarak SIRT1 karaciğerden glukoz çıkışını uyarır (Şekil 2-14) (6,101).

Açlık ve enerji sınırlaması sırasında karaciğer, lipid kullanımını arttırırken lipid ve kolesterol sentezini azaltır. Azalmış yağ asidi oksidasyonu, insülin direnci ile ilişkili olan hepatik steatoza neden olur. SIRT1 açlığa yanıt olarak karaciğerde PPAR- α ve PGC-1 α 'yı aktive ederek mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunu arttırır. Ayrıca, karaciğerde lipid sentezinde yer alan SREBP ve LXR'yi regüle eder. SREBP-1C'yi deasetile ederek aktivitesinin inhibisyonuna neden olur, bu durum ise lipid sentezinde bir azalmayla sonuçlanır. Periferik dokulardan ters kolesterol transportuna katkıda bulunan LXR'yi deasetiller ve pozitif olarak regüle eder (102,103). Ayrıca, kolesterol katabolizmasında yer alan FXR'yi aktive eder (104,105). Böylece, SIRT1 PPAR- α , LXR ve FXR gibi nükleer reseptörlerin aktivasyonu yoluyla ve SREBP'nin negatif regülasyonu üzerinden lipid metabolizmasına etki eder ve karaciğer yağlanmasına karşı koruyucu bir etki gösterir. FXR ve LXR'yi uyararak safra asidi üretimini ve ters

kolesterol transportunu arttırırken, lipojenik ve kolesteroljenik genlerin ekspresyonunu azaltır (Şekil 2-14) (6,14,89,91).



Şekil 2-14. SIRT1'in karaciğerdeki etkisi (6)

SIRT1: Sirtuin 1, CRTC2: CREB-regüle edilmiş transkripsiyon koaktivatör 2, STAT3: Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü 3, FOXO1: FOXO: Forkhead box class O1, PGC-1α: Peroksizom proliferatör-aktif reseptör gamma koaktivatör-1α, PPAR-α: Peroksizom proliferatör-aktif reseptör-α, SREBP: Sterol düzenleyici element bağlama proteini, LXR: Karaciğer X reseptörü, FXR: Farnesoid X reseptörü

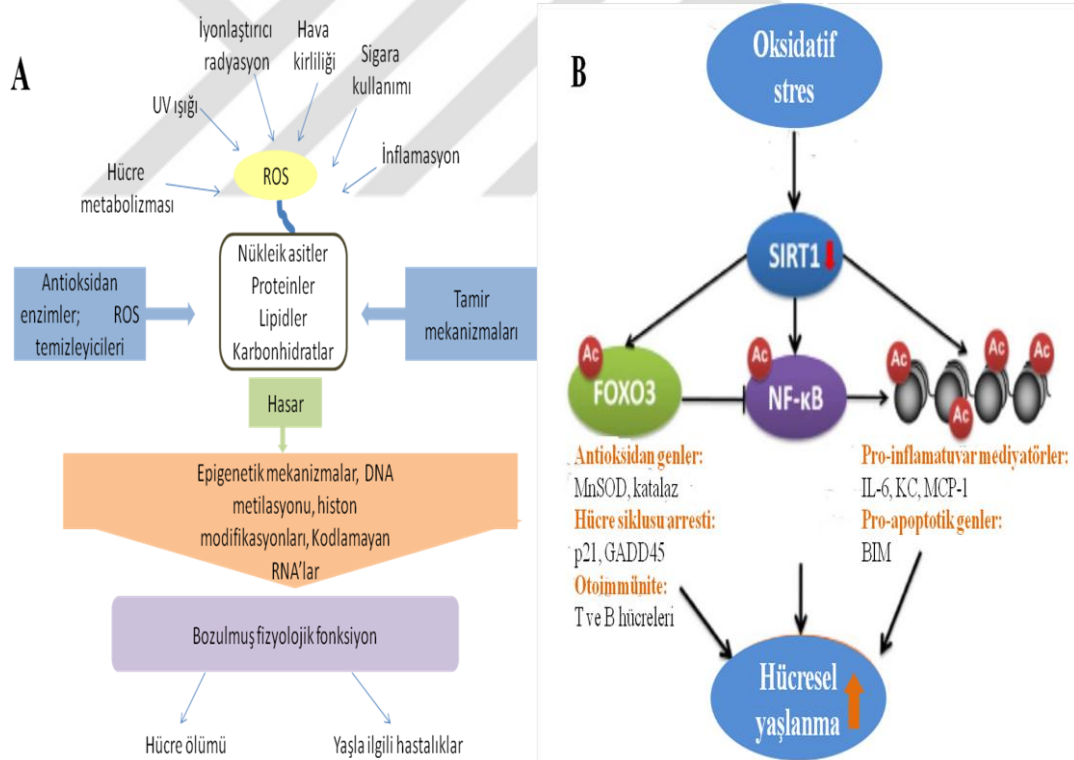
2.3.3.5. SIRT1'in oksidatif stres ve inflamasyondaki rolü

Yaş ilerledikçe enerji/metabolik düzenlenmede ve protein ekspresyonu ile üretilen ürünün kalitesinde bozukluklar oluşur. Özellikle mitokondride oluşan defektler, hidrojen peroksit, süperoksit anyon ve hidroksil radikalleri gibi ROS'ların oluşmasına neden olur. Yaşa bağlı olarak oksidatif stres artar ve bundan dolayı nükleik asit, lipid, karbonhidrat ve protein yapılarında bozukluklar ortaya çıkar. Bu bozukluklar da NF-κB ve FOXO gibi hücrel sinyal yollarını etkiler ve çeşitli sağlık sorunlarına yol açar (Şekil 2-15) (106-108).

SIRT1 NF-κB yolağı üzerinden ROS'ların oluşumunu engeller ve makrofaj infiltrasyonunu azaltır. p65 altünitesine bağlanarak, NF-κB yolağını inhibe eder. Monosit/makrofajlardaki NF-κB'nin deasetilasyonu yoluyla inflamasyon ve doku infiltrasyonunu negatif olarak regüle eder. SIRT1 inaktivasyonu, bozulmuş otofaji

aracılığıyla NF- κ B yolağının aktivasyonu üzerinden iltihaplanmaya neden olur (6,106,109).

Oksidatif stres, insülin sinyal yolağını bozar ve insülin direncinin başlamasına ve ilerlemesine yol açar. Hiperglisemi durumunda serbest yağ asidi içeren metabolitler ve TNF- α gibi sitokinler mitokondriden ROS'ların aşırı üretilmesine neden olur. ROS'lar, serin/treonin kinazların aktivasyonunu tetikler, bu durum IRS-1'in serin fosforilasyonunu arttırırken, tirozin fosforilasyonunu azaltır ve insülin direnci ve iltihaplanmaya neden olur. SIRT1 tarafından PGC-1 α 'nın deasetilasyonu ise MnSOD gibi anti-oksidatif enzimlerin aşırı ekspresyonuna ve mitokondriyal biyogeneze aracılık eder, böylece bozulmuş mitokondriden oksidatif stres azalır (6,106,110). Ayrıca, SIRT1 FoxO sinyal yolağı üzerinden (FOXO3a'yı deasetile ederek) katalaz gibi antioksidanların salınımını arttırarak hücreyi oksidatif strese karşı korur (Şekil 2-16) (109,111).



Şekil 2-15 (A) ve Şekil 2-16 (B). SIRT1'in oksidatif stres ve inflamasyondaki etkisi (108,109)

ROS: Reaktif oksijen türleri, SIRT1: Sirtuin 1, NF- κ B: Nükleer faktör- κ B, FOXO3: Forkhead box class O3, Ac: Asetilasyon, MnSOD: Manganeze bağlı süperoksit dismutaz, p21: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A, GADD45: Büyümenin durdurulması ve DNA hasarı-indüklenebilir 45, IL-6: İnterlökin-6, KC: Keratinosit kemoatraktan, MCP-1: Monosit kemoatraktan protein-1, BIM: Bcl-2 benzeri protein 11

2.4. MikroRNA (miRNA)

MikroRNA (miRNA)'lar transkripsiyonu olan fakat translasyonu gerçekleştirilmeyen küçük, tek sarmallı ve 21-24 nükleotid uzunluğunda olan fonksiyonel ribonükleik asit (RNA) molekülleridir. Genel olarak bir veya birden fazla hedef geni baskılayarak translasyonun engellenmesine ve/veya ilgili mesajcı ribonükleik asidin (mRNA) yıkılmasına neden olurlar. Hedef mRNA'lara etki ederek ilgili genlerin ekspresyonlarını regüle ederler. Hücresel gelişim, farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerde önemli rol oynarlar (16,17).

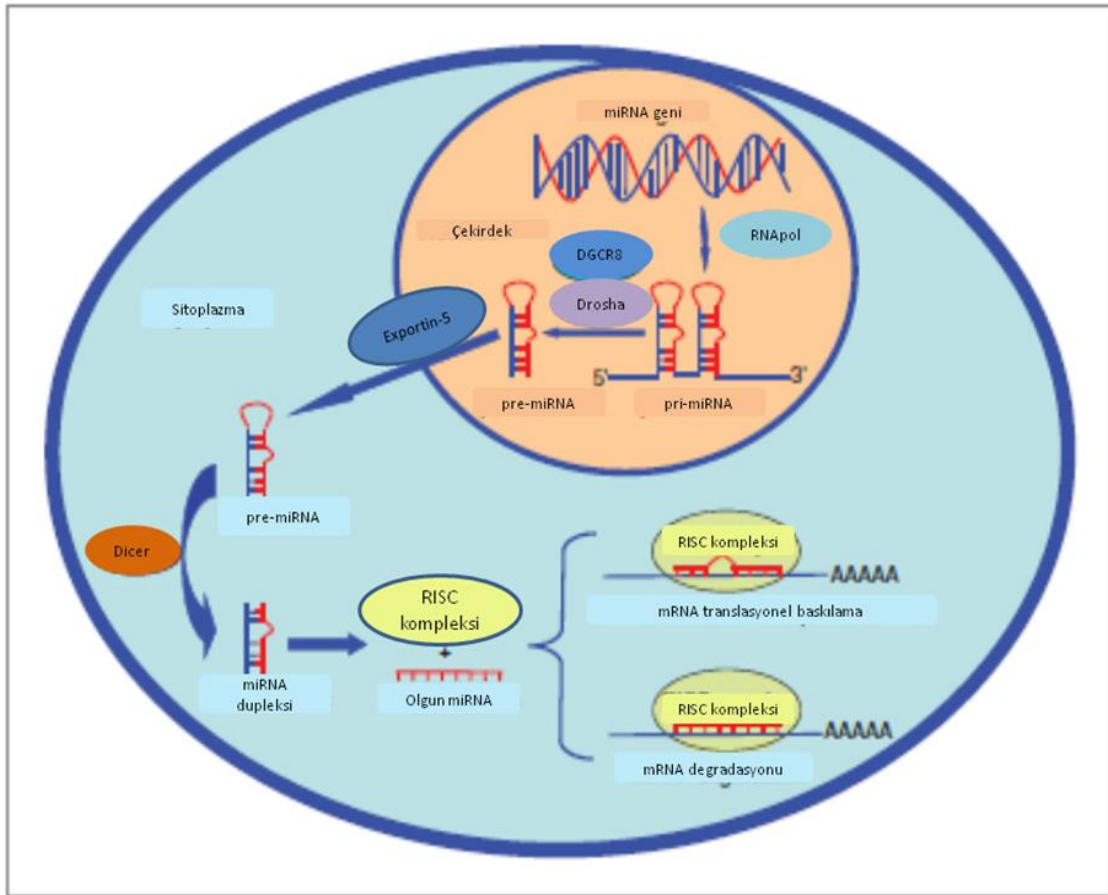
2.4.1. miRNA Biyogenezi ve Fonksiyonu

İlk miRNA, *Caenorhabditis elegans*'daki lin-4 geninin herhangi bir protein kodlamamasına rağmen küçük bir RNA molekülünü transkribe etmesiyle tanımlanmıştır. Daha sonra yine *Caenorhabditis elegans*'da let-7 olarak isimlendirilen bir miRNA keşfedilmiştir. Sonraki yıllarda ise birçok organizmada miRNA molekülleri tanımlanmış ve çeşitli hastalıkların patogeneziindeki rolleri araştırılmıştır (112,113).

miRNA biyogenezi hedef miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu, çekirdek içinde pri-miRNA'ların prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara dönüştürülmesi, pre-miRNA'ların çekirdekten sitoplazmaya taşınması ve sitoplazma içinde olgun miRNA'ların oluşumunu içeren bir süreci kapsar. Olgun miRNA'lar mRNA destabilizasyonuna veya translasyonel inhibisyona neden olarak işlev görürler (114-119).

İlk olarak çekirdekte RNA polimeraz II enzimi aracılığıyla ilgili miRNA geninin transkripsiyonu gerçekleşir ve uzun pri-miRNA molekülü oluşur. Pri-miRNA, Drosha (RNAaz III enzimi) ve kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8, Pasha)'den oluşan bir mikro işlemci kompleks tarafından kesilir ve 60-70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA molekülü meydana gelir. Drosha enzimi pre-miRNA'nın 3' ucunda 2 nükleotidlik bir çıkıntı bırakır (120). Pre-miRNA, bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer protein olan RAS-ilişkili nükleer protein-guanozin trifosfata (Ran-GTP) bağımlı olarak çekirdekten sitoplazmaya taşınır (121). Pre-miRNA sitoplazmaya taşındıktan sonra çıkıntı yapan 2 nükleotidlik diziyi tanıyan Dicer (RNAaz III enzimi) tarafından kesilir ve 21-24 nükleotid uzunluğunda çift iplikli miRNA oluşur (122). RNA-indüklenmiş susturma kompleksinin (RISC) içinde yer alan Argonaute

proteininin etkisiyle iki iplikten 5' ucu daha kararlı olan seçilip klavuz iplik olarak RISC kompleksine dahil edilir. Anti-klavuz (yolcu) iplik ise RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. Olgun miRNA RISC kompleksine entegre olduktan sonra baz eşleşme özelliği ile hedef mRNA'nın yıkılmasına veya translasyonun baskılanmasına neden olur (123). miRNA'nın hedef mRNA'ya nasıl komplementer olduğu önemlidir. Açık okuma çerçevesi (ORF) bölgesi içine bağlanma olduğunda tam olarak eşleşme sağlanır ve Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkılmasına neden olur. 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgeye (UTR) bağlanma olduğunda ise tam olarak eşleşme sağlanmaz ve translasyonun baskılanmasına yol açar (Şekil 2-17) (124-126).



Şekil 2-17. miRNA'ların biyogenezi ve mekanizması (126)

miRNA: MikroRNA, pri-miRNA: Primer mikroRNA, Drosha: RNAaz III enzimi, DGCR8: DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8, pre-miRNA: Prekürsör mikroRNA, Exportin-5: Nükleer taşıma reseptörü, RAN: RAs-ilişkili nükleer protein, GTP: Guanozin trifosfat, Dicer: RNAaz III enzimi, RISC: RNA-indüklenmiş susturma kompleksi

2.5. DİYABET ve miRNA'LAR ARASINDAKİ İLİŞKİ

Diyabet, yüksek kan şekeri ile karakterize edilen ilerleyici metabolik bir hastalıktır ve insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. WHO'ya göre dünya genelinde diyabet hastalığına yakalanmış 400 milyondan fazla insan bulunmakta olup bu sayının 2030'a kadar 552 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (1). Diyabet, yaklaşık olarak 3000 yıl önce eski Mısırlılar tarafından rapor edilmiştir (24). 1936'da T1DM ve T2DM arasındaki fark açık bir biçimde tanımlanmıştır (25). Diyabet tanısı alan hastaların %5-10'unda T1DM ve yaklaşık %90'ında ise T2DM görülür. T1DM, pankreasta adacık hücreleri tarafından yeterli miktarda insülinin üretilmediği ve yüksek kan şekeri seviyesi ile sonuçlanan bir şeker hastalığı formudur. Ancak, T1DM'nin kesin nedeni hala bilinmemektedir. Çoğu durumda bağışıklık sisteminin yanlışlıkla pankreastaki insülin üreten hücrelere saldırdığı bir durum olan otoimmün bir hastalıktır. T1DM çoğunlukla çocuklar, ergenler veya genç erişkinlerde teşhis edilir (25). Yüksek kan şekeri, insülin direnci ve nispi insülin eksikliği ile karakterize olan T2DM'nin oluşumunda ise genetik, çevresel ve davranışsal faktörler etkilidir (27). T1DM'den farklı olarak T2DM genellikle yetişkinlerde görülür.

miRNA'lar kısa, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda kodlamayan RNA molekülleridir (127). Çoğu durumda miRNA, mRNA'nın yıkılmasına veya mRNA translasyonunun inhibe olmasına neden olarak post-transkripsiyonel seviyede negatif düzenleyici olarak görev yapar (128). miRNA'ların normal olmayan ifadesi hem fizyolojik hem de patolojik süreçleri etkiler.

miRNA'lar diyabetin patogenezinde rol oynamaktadır. miRNA'nın disregülasyonu glukoz metabolizmasının bozulmasına neden olabilir (129,130). Son yıllarda T2DM'li hastalara veya hiperglisemik hayvan modellerine ait pankreas ve karaciğer gibi çeşitli dokularda miRNA ekspresyon profilleri saptanmış ve bu durum diyabetteki yeni miRNA regülatörlerinin ortaya çıkmasını kolaylaştırmıştır.

2.5.1. miRNA'lar ve Pankreatik β -Hücreleri

Pankreatik β -hücreleri insülinin salgılanması yoluyla glukoz homeostazında merkezi bir rol oynar (131). miRNA'lar ise genellikle β -hücre sağkalımı ve apoptoz, β -hücre proliferasyonu, β -hücre farklılaşması ve özellikle insülin sekresyonunun regülasyonu üzerinden β -hücrelerini etkilerler (Tablo 2-8) (132).

Tablo 2-8. Pankreatik β -hücre fonksiyonunda rol alan temel miRNA'lar (132)

miRNA	Hedefi	Hücre Prosesi	Hücre/Doku	Tür
miR-577	Fgf-21	β -hücre sağkalımı/ apoptoz	INS-1 hücreleri	Sıçan
miR-200a/b/c	-		Diyabetik fare adacıkları	Fare
miR-34a	Bcl-2		MIN-6 hücreleri	Fare
miR-375	Cadm1	β -hücre proliferasyonu	miR-375 KO fare adacıkları,	Fare,
			INS-1E hücreleri	sıçan
miR-181a	Pdgfra		3 ve 12 aylık sıçan adacıkları	Sıçan
miR-17	Menin		MIN-6 hücreleri	Fare
miR-24	Hnf1a,		Obez farelerin adacıkları	Fare
	Neurod1			
miR-29a	-		INS-1E hücreleri	Sıçan
miR-375	HNF1 β	β -hücre farklılaşması	hPSCs differentiated IPCs	İnsan
miR-7	PAX6		hPSCs differentiated IPCs	İnsan
miR-34a	-		hPSCs differentiated IPCs	İnsan
miR-146a	-		hPSCs differentiated IPCs	İnsan
miR-30d	RFX6		hPSCs differentiated IPCs	İnsan
let-7e	RFX6		hPSCs differentiated IPCs	İnsan
miR-21	SOX6, RBJ		Pankreatik progenitör hücreler	İnsan
miR-9	-		İnsan fetal adacıkları	İnsan
miR-376	-		İnsan fetal adacıkları	İnsan

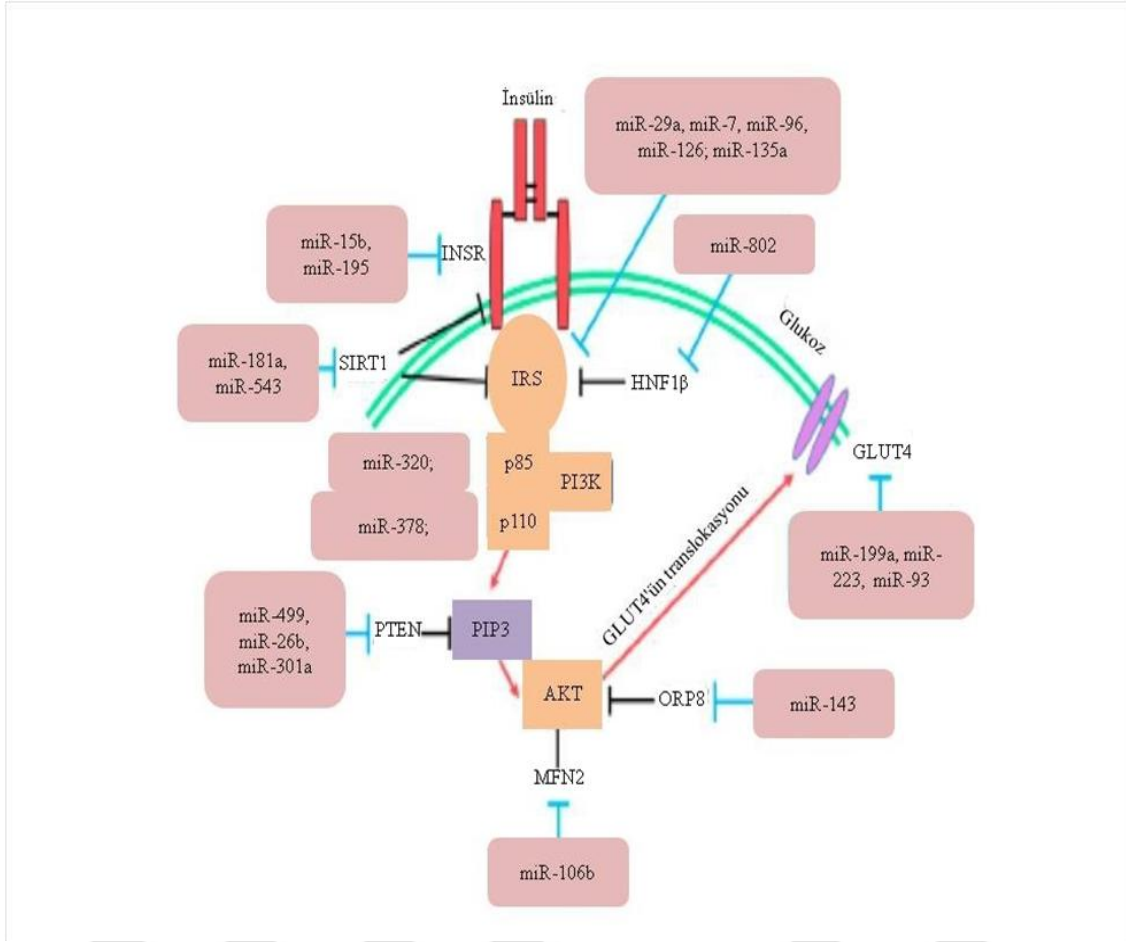
miR-375	Mtpn		MIN-6 hücreleri	Fare
miR-184	Ago 2		MIN-6 hücreleri	Fare
miR-7a	-		Diyabetik farelerin β -hücreleri	Fare
miR-29a	Stx-1a, Mct1		Sıçan adacıkları, fare adacıkları	Sıçan, fare
miR-187	HIPK3		T2DM hastalarından insan adacıkları	İnsan
miR-30a	β 2, NeuroD1	İnsülin sekresyonu	Sıçan adacıkları ve INS-1 hücreleri	Sıçan
miR-124	Rab27a, Foxa2		İnsan adacıkları, MIN-6 hücreleri	İnsan, fare
miR-33	Abca1		Fare adacıkları, MIN-6 hücreleri	Fare

miRNA: MikroRNA, Fgf-21: Fibroblast büyüme faktörü 21, INS: İnsülin, MIN-6: Pankreatik beta hücre hattı, Bcl-2: B hücreli lenfoma-2, Cadm1: Hücre adhezyon molekülü 1, Pdgfra: Trombosit türevi büyüme faktörü reseptörü, α polipeptid, Hnf1a: Hepatosit nükleer faktör 1 homeobox A, Neurod1: Nörojenik farklılaşma 1, HNF1 β : Hepatosit nükleer faktör 1 homeobox β , PAX6: Paired box 6, RFX6: Düzenleyici faktör X6, SOX6: Cinsiyet belirleme bölgesi Y-box 6, Mtpn: Myotrophin, Ago 2: Argonaute 2, Stx-1: Syntaxin 1, Mct1: Monokarboksilat taşıyıcı 1, HIPK3: Homeodomain-etkileşen protein kinaz 3, Rab27a: Ras ile ilgili protein Rab-27A, Foxa2: Forkhead box protein A2, Abca1: ATP bağlayıcı kaset subfamiliya A üye 1

2.5.2. miRNA'lar ve İnsülin Sinyal Yolağı

İnsülin sinyal yolağı oldukça karmaşık olan bir ağ olup hücre yüzeyindeki insülin reseptörüne bağlanan insülin ve ardından fosfoinositid 3-kinaz (PI3K), AKT serin/treonin kinaz (AKT) ve glukoz taşıyıcı 4 (GLUT4) dahil olmak üzere downstream sinyalizasyon basamaklarına etki eden insülin reseptör substratı tarafından başlatılır. Ligand-reseptör etkileşimi insülin sinyalizasyonunun ilk adımıdır ve bunu reseptör otofosforilasyonu ve reseptör tirozin kinazların aktivasyonu izler. Bu durum ise IRS-1 ve IRS-2 gibi insülin reseptör substratlarının fosforilasyonuna yol açar (132-135). IRS-1, insülin reseptöründen (INSR) downstream enzimlerine sinyalleri ileterek periferik dokulardaki insülin sinyal yolağında anahtar molekül olarak görev yapar. IRS-2 ise IRS-1'in eksik olduğu durumlarda INSR'nin alternatif substratıdır. PI3K ise insülin sinyal yolağında IRS-1 ile ilgili çok önemli bir kinaz olup düzenleyici alt birim P85 ve katalitik alt birim P110'dan oluşur. IRS'lerin Src homoloji 2 (SH2) alanları vasıtasıyla PI3K'nın düzenleyici alt birimine bağlanması 3' pozisyonunda membran

fosfolipidlerini ve fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatı (PIP2) fosforile eden PI3K'nın aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu kompleks, Akt/protein kinaz B ve atipik protein kinaz C'nin aktivasyonu ile sonuçlanan 3-fosfoinositid bağımlı protein kinazları (PDK-1 ve PDK-2) aktive eder (132,136-140). Bir başka deyişle, IRS'den gelen sinyale yanıt olarak PI3K aktive edilmesi AKT'ın fosforilasyonuna yol açar. Aktif Akt ise insülin aracılı GLUT4'ün hücre içi veziküllerinden plazma membranına translokasyonunu uyaran 160 kDa substratı (AS160) fosforile eder (141). Buna ek olarak insülin reseptörü, insülin etkisi ve glukoz metabolizması üzerinde olumsuz etkilere neden olan ve geniş bir protein ailesinden oluşan protein PTP'ler tarafından defosforile ve inaktive edilir (142,143). Bir lipid fosfataz olan fosfataz ve tensin homologu (PTEN), PI3K aktivasyon ürünü olan fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfatı (PIP3) PIP2'ye hidrolize ederek PI3K yolağına karşı antagonize bir etki gösterir ve PIP3'ün defosforilasyonu ile PI3K sinyalini negatif olarak düzenler (144,145). İnsülin sinyal yolağında son adım olarak GLUT4 aracılı glukoz alımı glukoz homeostazının muhafaza edilmesinde önemlidir. Sonuç olarak, insülin etkisinin fizyolojik regülasyonu fosforilasyon ve defosforilasyon arasındaki dengeyle kontrol edilir ve miRNA'lar bu yolda önemli rol oynar (Şekil 2-18) (132,146).



Şekil 2-18. İnsülin sinyal yolağındaki proteinler ve miRNA'lar (132)

Kırmızı ok: Aktivasyon, Siyah T ok: İndirekt inhibisyon, Mavi T ok: Direkt inhibisyon

INSR: İnsülin reseptörü, IRS: İnsülin reseptör substratı, PI3K: Fosfoinositid 3-kinaz, SIRT1: Sirtuin 1, PTEN: Fosfataz ve tensin homoloğu, PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat, Mfn2: Mitofusin 2, AKT: AKT serin/treonin kinaz, Orp8: Oksisterol bağlayıcı protein benzeri 8, HNF1β: Hepatosit nükleer faktör 1-β, GLUT4: Glukoz taşıyıcı 4

İnsülin hormonu, karaciğerde glikoneogenezi ve glikojenolizi baskılar ve böylece hepatik glukoz üretimini engeller. Glukozu periferik dokulara taşıyarak glikojen olarak depolanmasını veya okside olmasını sağlar. Önemli bir morbidite nedeni olan insülin direnci ise obezite, hipertansiyon ve hiperlipidemi ile ilişkili olup yeterli miktarda insülin hormonu üretildiği halde etkin olarak kullanılamamasını ifade eder. İnsülin direnci oluştuğunda hücre içine glukoz giremez ve bu durum kanda glukoz seviyesinin yükselmesine neden olarak insülin sinyal yolağının uyarılmasına yol açar. Sonuçta hem hiperglisemi hem de hiperinsülinemi oluşur. İnsülin direnci, insülin sinyalizasyonundaki kusurlarla ilişkili olup miRNA'lar bu yolda önemli rol oynar (Tablo 2-9) (132,147,148).

Tablo 2-9. İnsülin direncinde rol alan temel miRNA'lar (132)

miRNA	Hedefi	Hücre Prosesi	Hücre/Doku	Tür
miR-15b miR-195	INSR	İnsülin direnci	Diyabetik farelerin hepatositleri HepG2 hücreleri	Fare İnsan
miR-29a miR-7 miR-96 miR-126	IRS-1		L6 hücreleri C2C12 hücreleri SK-Hep1 hücreleri Yağ doku	Sıçan Fare İnsan İnsan
miR-135a	Irs-2		C2C12 hücreleri	Fare
miR-378 miR-320	PI3K		miR-378/378* KO farelerin hepatositleri 3T3-L1 hücreleri	Fare
miR-199a miR-223 miR-93	GLUT4		L6 hücreleri İnsan farklılaşmış adipositleri Subkütan yağ dokusu	Sıçan İnsan İnsan
miR-499 miR-26b miR-301a	PTEN		NCTC 1469 hücreleri, db/db farelerin karaciğerleri İnsan insüline dirençli adipositleri NCTC 1469 hücreleri	Fare İnsan Fare
miR-143	Orp8		HL-1 hücreleri Obez farelerin karaciğerleri	Fare
miR-181a miR-543	SIRT1		HepG2 hücreleri	İnsan
miR-29	Pparδ		C2C12 hücreleri	Fare
miR-103/107	Cav-1		Diyetle indüklenen obez farelerin karaciğerleri ve yağ dokuları	Fare
miR-802	Hnf1β		Hepa1-6 hücreleri	Fare
miR-106b	Mfn2		C2C12 hücreleri	Fare

miR-378/378*: miR-378 ve miR-378* aynı pre-miRNA'nın karşıt kollarından kaynaklanan iki olgun mikroRNA'dır.

* işareti, hücrelerde düşük seviyelerde bulunan olgun türleri belirtir.

miRNA: MikroRNA, INSR: İnsülin reseptörü, IRS-1: İnsülin reseptör substratı-1, IRS-2: İnsülin reseptör substratı-2, PI3K: Fosfoinositid 3-kinaz, GLUT4: Glukoz taşıyıcı eleman 4, PTEN: Fosfataz ve tensin homologu, Orp8: Oksisterol bağlayıcı protein benzeri 8, SIRT1: Sirtuin 1, Pparδ: Peroksizom proliferatör-aktif reseptör δ, Hnf1β: Hepatosit nükleer faktör 1 homeobox β, Mfn2: Mitofusin 2

2.6. SIRT1 EKSPRESYONUNUN miRNA'LAR İLE DÜZENLENMESİ

NAD⁺ bağımlı deasetilaz olan SIRT1, birçok transkripsiyon düzenleyicisini deasetile ederek ve metabolizma, inflamasyon, hücre sağkalımı, uzun yaşam ve sirkadiyen ritim üzerine etkide bulunarak işlev görür. Kanseri, kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar gibi birçok hastalığın önlenmesi ve iyileştirilmesinde tedavi edici bir hedef olma potansiyeli nedeniyle ön plana çıkar (21,149).

SIRT1 ekspresyonu, fizyolojik ve patolojik koşullar altında transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve post-translasyonel mekanizmalar ile birden fazla seviyede kontrol edilir. Fizyolojik koşullardaki açlık ve beslenme döngüsü sırasında enerji homeostazı ve metabolik adaptasyonu korumak için SIRT1 ekspresyonunun kontrol edilmesi ve düzenlenmesi oldukça önemlidir (150-155). SIRT1 metabolizmanın düzenlenmesinde görev alır ve diyabet gibi metabolik hastalıkları modüle eder (156). Yağ birikimini ayarlar, mitokondriyal biyogenezi düzenler ve yağ asidi oksidasyonunu aktive eder. Fare çalışmaları SIRT1'in önemli fizyolojik etkilerini ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışmalarda SIRT1'in kalori kısıtlaması sırasında farelerin metabolizmasını etkilediği (157), SIRT1'i aşırı eksprese eden transgenik farelerin insülin direnci ve glukoz toleransı gibi bazı patolojik koşullardan korundukları (158) ve SIRT1'in sentetik bir aktivatörü olan SIRT1720 ile tedavi edilen farelerin de diyetle indüklenen obezite ve insülin direncinden korundukları (159) gösterilmiştir. Bu bulgular, SIRT1'in memeli metabolizmasını düzenlediğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, SIRT1 transgenik farelerin yüksek yağlı diyetle indüklenen obezite ve karaciğer steatozundan korunduğu (158,160), buna karşılık yüksek yağlı diyetle beslenen SIRT1 heterozigot farelerde vücut ağırlığının arttığı, karaciğer steatozu ve inflamasyonun görüldüğü saptanmıştır (161). Bu veriler SIRT1'in sistemik metabolizmayı düzenlediğini göstermektedir.

miRNA'lar SIRT1 ekspresyonunun önemli düzenleyicisidirler (156). miR-34a, miR-181a, miR-132, miR-146, miR-143, miR-9 ve miR-217 gibi miRNA'lar karaciğer, pankreas, yağ doku ve endotel hücreleri gibi birçok hücre/dokuda SIRT1'i hedefleyerek lipid metabolizması, karaciğer yağlanması, glukoz homeostazı, hepatik insülin sinyalizasyonu, insülin sekresyonu, β hücre apoptozu, adiposit farklılaşması ve endotelial hücre yaşlanmasını içeren birçok hücresel işlevde önemli rol oynarlar (Tablo 2-10) (22,156,162-186).

Tablo 2-10. SIRT1'i hedefleyen miRNA'lar

miRNA	Hücre/Doku/ Hastalık	İşlevi
miR-34a	Karaciğer Pankreas Yağ Kanser hücresi Endotel hücresi Beyin	Lipid metabolizması, karaciğer yağlanması (156,162) İnsülin sekresyonu, β hücre apoptozu (164) Adiposit farklılaşması (177) Pankreatik, kolorektal, prostat, beyin, karaciğer, kolon (163,166,172-176) Endotelial hücre yaşlanması (170) Nörodejeneratif yaşla bağlantılı hastalık, sinirsel farklılaşma (169,179)
miR-181a	Karaciğer	Hepatik insülin sinyalizasyonu Glukoz homeostazi (22)
miR-9 miR-146	Pankreas	İnsülin sekresyonu β hücre apoptozu (164,165)
miR-143 miR-132	Yağ doku	Adiposit farklılaşması Trigliserid birikimi İnflamatuvar sitokin indüksiyonu Stresle indüklenen kemokin üretimi (166-168)
miR-93	Karaciğer	Yaşlanma (186)
miR-217	Endotel hücresi	Endotelial hücre yaşlanması (171)
miR-449a	Kanser hücre hattı	Büyümenin engellenmesi Apoptoz (180)
miR-143/145	Pankreas kanseri	Büyümenin durdurulması Apoptoz (166)
miR-449	Mide kanseri	Apoptoz Yaşlanma (181)
miR-22	Fibroblast ve kanser	Büyümenin ve metastazın engellenmesi Yaşlanma (182)
miR-200a	Memeli epitel hücresi	Epitelden mezenkimale geçiş (EMT) (183)
miR-195	Kardiyomiyosit	Palmitat ile indüklenen apoptoz (184)
miR-199a	Kalp	İskemi (185)
miR-34c	Beyin	Hafıza bozukluğu (169,178)

2.6.1. SIRT1 Ekspresyonunun miR-34a İle Düzenlenmesi

miR-34a, SIRT1'i düzenleyen ilk tanımlanmış miRNA olup nöroblastomda bir tümör süpresör geni olarak keşfedilmiştir ve SIRT1 mRNA'sının 3'UTR bölgesine bağlanarak SIRT1 ekspresyonunu azaltır (156,162,163,187). Yapılan çalışmalarda pankreatik, kolorektal, prostat, beyin, karaciğer ve kolon kanseri gibi kanserlerde miR-34a'nın SIRT1'i regüle ettiği tespit edilmiştir (163,172-176,188).

miR-34a, kardiyovasküler sistemde SIRT1 üzerinden anjiyogenez ve hücresel yaşlanmanın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. SIRT1 aracılığıyla endotel hücrelerinde yaşlanmayı teşvik eder (170). Yapılan bir çalışmada miR-34a'nın yaşlanmanın uyarılmasıyla endotelial progenitör hücre aracılı anjiyogenezi inhibe ettiği belirtilmiştir (189).

miR-34a, SIRT1 üzerine etkide bulunarak hücresel metabolizmayı etkiler. SIRT1, PGC-1 α ile doğrudan etkileşime girer ve onu deasetile eder (190). Önemli bir adipojenik transkripsiyon faktörü olan PPAR- γ 'yı bastırır ve beyaz adipositlerdeki yağ mobilizasyonunu teşvik eder (84). SIRT1'in hepatosit spesifik delesyonu, PPAR- α sinyalizasyonunu ve yağ asidi β oksidasyonunu bozarak hepatik steatoz ve inflamasyona neden olur (191). Yapılan çalışmalarda yüksek yağlı diyetle beslenen obez farelerde ve genetik olarak leptin eksikliği bulunan obez farelerde hepatik miR-34a seviyesi oldukça yüksek bulunmuştur. Diyetle indüklenen obez farelerin ve ob/ob farelerin yağlı karaciğerlerinde miR-34a seviyesinin yükseldiği ve SIRT1 seviyesinin ise düştüğü saptanarak miR-34a'nın karaciğerde SIRT1'i düzenlediği tespit edilmiştir. Nükleer reseptör FXR'den yoksun metabolik hastalığa yatkın farelerde miR-34a, en belirgin şekilde yüksek olan miRNA olarak belirlenmiştir (156,162). miR-34a hem diyet yapan hem de genetik obez farelerde en yüksek seviyede bulunan karaciğer miRNA'sı olarak tanımlanmıştır (192). Obeziteye bağlı karaciğer steatozlu hastalarda hepatik miR-34a düzeyinin önemli ölçüde yükseldiği belirlenmiştir (193). Sıçanların karaciğerlerinde yaşlanma sırasında miR-34a ekspresyonunun arttığı gösterilirken (194) miR-34a downregülasyonunun diyetle indüklenen obez farelerin yağlı karaciğerlerinde SIRT1 seviyesini düzelttiği ve bu durumun sonucunda karaciğer yağlanmasında azalma ile glukoz toleransı ve insülin duyarlılığında artma gibi faydalı transkripsiyonel ve metabolik cevaplar oluştuğu saptanmıştır (195,196). Pankreasta ise miR-34a aşırı

ifadesinin insülin sekresyonunu inhibe ettiği görülmüştür (164). Bu sonuçlar, miR-34a'nın SIRT1 üzerinden glukoz ve insülin homeostazını etkilediğini göstermektedir.

2.6.2. Diğer miRNA'lar Tarafından SIRT1 Ekspresyonunun Düzenlenmesi

SIRT1 ifadesi, periferik metabolik dokularda ve beyinde diğer miRNA'lar tarafından inhibe edilerek düzenlenir. miR-181a, doğrudan SIRT1 mRNA'sının 3'UTR bölgesine bağlanarak SIRT1 ekspresyonunu inhibe eder. Yapılan çalışmalarda miR-181a seviyesinin insüline dirençli hepatositlerde ve diyabetli hastaların serumunda yükseldiği gösterilmiştir. miR-181a aşırı ekspresyonunun hepatik insülin sinyalizasyonunu azalttığı ve downregülasyonunun ise diyetle indüklenen obez farelerde glukoz homeostazını iyileştirdiği tespit edilmiştir (22).

Glukoz metabolizmasını düzenleyen pankreas ve yağ dokuda SIRT1 ifadesini kontrol eden miR-9 ve miR-132, insülin sekresyonunda ve stresle indüklenen kemokin üretiminde rol alır (165,168). miR-9, pankreatik β hücrelerinde SIRT1 seviyesini düzenler (165). Adipositlerde ise miR-132 SIRT1 regülasyonunu etkiler. Yağ dokusu, metabolik bozukluklara katkıda bulunan bir dizi proinflamatuvar araçları salgılar. Serum yoksunluğu, adipositlerdeki IL-8 ve MCP-1 gibi kemokinlerin üretimini uyarır. Düşük serum koşullarında miR-132 ekspresyonu upregüle edilir ve direkt SIRT1'i hedef alan miR-132, SIRT1 ekspresyonunu azaltırken NF-KB'nin asetilasyon seviyesini ve MCP-1 ve IL-8 gibi kemokinlerin üretimini artırır (168). Pankreatik hücrelerde miR-34a ve miR-9'un yanı sıra miR-146 da SIRT1'i hedef alan bir miRNA'dır ve azalmış ekzositoz ve β hücre apoptozunun bir sonucu olarak insülin sekresyonunda azalma meydana gelir (164,165). 3'UTR bölgesini hedef alan miR-143 ise yağ dokuda SIRT1 ekspresyonunu baskılar ve adipogenezin uyarılmasına, glukoz alımının azalmasına ve glukoz intoleransının düşmesine neden olur (166,167).

Direkt olarak SIRT1'i hedefleyen miR-22, miR-217 ve miR-34a/c gibi bazı miRNA'ların ekspresyon seviyeleri yaşlanma sırasında artar, bu artış karaciğer, kalp ve nöronlarda hücresel yaşlanmayı hızlandırır ve bu durum azalmış SIRT1 seviyesi ile ilişkilendirilir (169,197). miR-217 ve miR-34a SIRT1 üzerinden endotelial yaşlanmayı düzenler (170,171). miR-34a SIRT1 aracılığıyla endotel hücrelerinde yaşlanmayı teşvik eder (170). Yapılan çalışmalarda miR-217 inhibisyonunun SIRT1 ekspresyonunu arttırdığı, yaşlı insan umbilikal ven endotel hücresinde (HUVEC) hücresel yaşlanmayı teşvik ettiği, miR-217 seviyesinin karotis endarterektomi uygulanan hastalardan alınan

aterosklerotik plaktaki SIRT1 ekspresyonu ile negatif olarak ilişkili olduğu ve miR-217'nin SIRT1'i inhibe ederek, nitrik oksit bulunabilirliğini azaltarak ve FoxO1'i deasetile ederek aterosklerozun gelişimindeki yaşlanmada önemli bir rol oynadığı saptanmıştır (171).

T2DM ve SIRT1 ekspresyonunun nasıl düzenlendiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda miRNA'ların SIRT1 ekspresyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında SIRT1 ve SIRT1 protein regülasyonunda rol oynayan miRNA genlerinin (miR-34a, miR-217, miR-9, miR-132 ve miR-181a) Türk diyabetik hastalardaki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Elde edilecek verilerle literatüre katkı yapılması, dizayn edilecek yeni çalışmalara zemin hazırlanması, T2DM fizyopatolojisine yönelik yeni bilgiler elde edilmesi, ilgili genlerin diyabet tanısı için biyomarker olarak kullanılıp kullanılamayacağı ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlanması çalışmamızın hedefleri arasındadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI VE ELDESİ

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grupta Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Polikliniğine başvurmuş ve tip 2 diyabet tanısı konulmuş 25-65 yaş arası 25 birey ve ikinci grupta ise kontrol olarak kullanılmak üzere tip 2 diyabet hastalığı olmayan 25-65 yaş arası 25 birey çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya katılan bireylerden alınan kan örneklerinden santrifüj yöntemiyle serum elde edilmiş olup örnekler çalışmaya başlayıncaya kadar (yeterli numune sayısına ulaşana kadar) -80 °C’de muhafaza edilmiştir. SIRT1 protein düzeyini incelemek için enzim ilintili immün test (ELISA) ve SIRT1 protein regülasyonunda rol oynayan miRNA genlerinin (miR-34a, miR-217, miR-9, miR-132 ve miR-181a) ekspresyon seviyelerini saptamak için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR) yöntemleri kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasının yapılması için İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan gerekli izin alınmıştır.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE GEREÇLER

3.2.1. Kullanılan Malzemeler

miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, 217184)

TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher, 4366596)

TaqMan MicroRNA Assay (ID 000480) (Thermo Fisher, 4427975)

TaqMan MicroRNA Assay (ID 000457) (Thermo Fisher, 4427975)

TaqMan MicroRNA Assay (ID 000583) (Thermo Fisher, 4427975)

TaqMan MicroRNA Assay (ID 000426) (Thermo Fisher, 4427975)

TaqMan MicroRNA Assay (ID 002337) (Thermo Fisher, 4427975)

TaqMan MicroRNA Assay (ID 001093) (Thermo Fisher, 4427975)

TaqMan Universal Master Mix II, with UNG (Thermo Fisher, 4440038)

LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (Roche, 04729692001)

QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, 1023537)

Chloroform (BioChemica, A3691)

RNase Zap (Thermo Fisher, AM9780)

Absolute Ethanol (Sigma, 32221)

Human Sirtuin 1 (SIRT1) ELISA Kit (BT LABS, E2557Hu)

UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo Fisher, 10977035)

Pipet (Gilson, P10, P20, P100, P200, P1000)

1,5 ml'lik Mikrosantrifüj Tüpü (Santa Cruz, sc-200271)

0,5 ml'lik Mikrosantrifüj Tüpü (Santa Cruz, sc-200269)

0,2 ml'lik PCR tüpü (Santa Cruz, sc-205898-1)

15 ml'lik Santrifüj Tüpü (Isolab, S.078.02.002.050)

50 ml'lik Santrifüj Tüpü (Isolab, S.078.02.004.050)

Mikrosantrifüj Tüp Rack (Santa Cruz, sc-200207)

15 ve 50 ml'lik Santrifüj Tüp Rack (Santa Cruz, sc-201744)

0,2 ml'lik PCR Tüp Rack (Starlab, E2396-5240)

Örnek Saklama Kutusu (Santacruz, sc-200200-1)

0,5-10 µl Pipet Ucu (AXYGEN, TF-300-R-S)

100 µl Pipet Ucu (AXYGEN, TF-100-R-S)

1000 µl Pipet Ucu (AXYGEN, TF-1000-R-S)

Moleküler Genetik Uygulamaları İçin Gerekli Diğer Sarf Malzemeler

3.2.2. Kullanılan Cihazlar

PCR Cihazı (Biorad)

Real-Time PCR Cihazı (Roche)

Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific)

Multiskan Spectrum (Thermo Electron Corporation)

Santrifüj Cihazı (Beckman Coulter, Thermo Scientific)

-20°C Derin Dondurucu (Beko)

+4°C Buzdolabı (Beko)

-80°C Derin Dondurucu (Thermo Scientific)

Buz Makinası (Cornelius)

Vorteks (Stuart)

İnkübatör (Memmert)

3.3. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.3.1. Periferik Kandan Serum Ayrılması

Serum ayırmak için bireylerden alınan periferik kan örneği oda sıcaklığında 15-20 dakika kadar bekletildi. Daha sonra 4500 rpm’de ve +4 °C’de 5 dakika süre ile santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Tüplerdeki serum örnekleri steril pipet uçları ile alınarak 1,5 ml’lik steril polipropilen eppendorf tüplerine konuldu ve serum konulan tüpler -80 °C derin dondurucuda çalışma yapılıncaya kadar saklandı.

3.3.2. miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Çalışmaya katılan bireylerden alınan periferik kan örneklerinden elde edilen serum örnekleri moleküler çalışmalara başlayıncaya kadar -80 °C’de muhafaza edildi. Serumlardan önce total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA örneklerinin kantitatif ölçümleri yapıldıktan sonra tüm RNA örneklerinin konsantrasyonları 4 nanogram/mikrolitre (ng/μl) olacak şekilde eşitlendi. miRNA Reverse Transkriptaz Kit ile çevrim işlemi yapıldı. Real-Time PCR yöntemiyle SIRT1 protein regülasyonunda rol oynayan miRNA genlerinin (miR-34a, miR-217, miR-9, miR-132 ve miR-181a) serum düzeyinde ekspresyonu araştırıldı. Bu çalışmada endojen kontrol olarak RNU6B (U6) kullanıldı ve örnekler iki tekrarlı olacak şekilde çalışıldı.

3.3.2.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu miRNeasy Serum/Plasma Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce çalışmada kullanılacak tüm malzemeler RNase Zap ile temizlendi. Buffer RWT (15 ml) ve Buffer RPE (11 ml) solüsyonlarına sırasıyla 30 ml ve 44 ml %96-100'lük etanol eklendi. Soğutmalı santrifüj açıldı ve sıcaklığı +4 °C'ye ayarlandı.

Serum örnekleri -80 °C derin dondurucudan çıkartıldı ve donmuş örnekler çözdürüldü. Her bir örnekten 200 µl serum alınarak steril eppendorf tüplerine aktarıldı. Her bir serum örneğinin üzerine 1 ml (örneğin 5 katı kadar) QIAzol Lysis Reagent eklendi, pipetleme işlemini takiben vorteksleyerek solüsyonların karışması sağlandı. Homojenatlar 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Tüplerin üzerine 200 µl (başlangıçtaki serum örneği ile 1:1 oranda olacak şekilde) kloroform eklendi. Tüpler 15 saniye güçlü bir şekilde çalkalandıktan sonra 2-3 dakika oda ısısında inkübe edildi ve bu işlemi takiben 12,000xg'de ve +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Her bir tüpün üst fazı steril yeni 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Aktarılan sıvının 1,5 katı kadar %100'lük etanol eklendi ve pipetleme işlemi yapılarak iyice karışması sağlandı. Her bir kolona 700 µl solüsyon aktarıldı ve kapakları kapatıldıktan sonra 8,000xg'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Toplama tüplerinin içerisindeki sıvı boşaltıldı ve kolonlar tekrar toplama tüplerine yerleştirildi. Tüplerde kalan solüsyon olması durumunda ikinci kez aynı işlemler tekrarlandı. Her bir kolona 700 µl Buffer RWT eklendi ve kapakları kapatıldıktan sonra 8,000xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüplerinin içerisindeki sıvı boşaltıldı ve kolonlar tekrar toplama tüplerine yerleştirildi. Her bir kolona 500 µl Buffer RPE eklendi ve kapakları kapatıldıktan sonra 8,000xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüplerinin içerisindeki sıvı boşaltıldı ve kolonlar tekrar toplama tüplerine yerleştirildi. Her bir kolona 500 µl %80'lik etanol eklendi ve kapakları kapatıldıktan sonra 8,000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpleri atıldı ve kolonlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi. Membranın kuruması için her bir kolonun kapağı açılarak maksimum hızda 5 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpleri atıldı ve kolonlar yeni 1,5 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi. Her bir kolonun üzerine 14 µl RNase-free water eklendi. Kapakları kapatıldıktan sonra maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi takiben kolonlar atıldı ve toplama tüpleri buz üstüne alındı.

3.3.2.2. RNA'nın konsantrasyon ve kalitesinin belirlenmesi

Spektrofotometre ile ölçülen 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri kullanılarak RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı belirlendi. İzole edilen RNA örneklerinin Nanodrop 2000 Spektrofotometre cihazı kullanılarak 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri saptandı. 40 µg/ml tek zincirli RNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda 1 optik densite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak RNA konsantrasyonu hesaplandı.

$$\text{RNA Konsantrasyonu} = \text{OD}_{260} \times 40 \text{ µg/ml} \times \text{Sulandırma oranı}$$

RNA örneklerinin saflığını belirlemek için $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ oranı kullanıldı. RNA saflığı için en ideal $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ değeri 2'dir.

3.3.2.3. miRNA'nın reverse transkriptaz ile çevrimi

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları Nanodrop 2000 Spektrofotometre cihazı kullanılarak ng/µl cinsinden ölçüldü. Kantitatif ölçümlerin ardından tüm RNA örneklerinin konsantrasyonları 4 ng/µl olacak şekilde hesaplama yapılarak eşitlendi. TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit kullanılarak çevrim işlemi yapıldı (Tablo 3-1).

Tablo 3-1. miRNA'nın reverse transkriptaz ile çevrimi için karışım bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Birim miktar (µl)
Nuclease-free water	4,16
10X Reverse Transcription Buffer	1,5
100 mM dNTPs (with dTTP)	0,15
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,19
Multiscribe Reverse Transcirtase (50 U/µl)	1,00
5X Reverse Transcription Primer	3,00
RNA	5

Tabloda belirtildiği gibi miRNA'lara spesifik primerler kullanılarak karışımlar hazırlandı ve her bir PCR tüpüne 10'ar µl dağıtıldı. Bu işlemi takiben 5 µl önceden konsantrasyonu 4 ng/µl'ye eşitlenen RNA örnekleri eklendi. Böylece her bir tüpte total hacim 15 µl oldu. Reaksiyon T100 (Biorad) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 3-2).

Tablo 3-2. miRNA'nın reverse transkriptaz ile çevrimi için inkübasyon koşulları

İnkübasyon Koşulları	16 °C.....30 dakika
	42 °C.....30 dakika
	85 °C 5 dakika
	4 °C.....∞

3.3.2.4. Real-Time PCR

miRNA ekspresyon çalışmaları için TaqMan MicroRNA Assay ve TaqMan Universal Master Mix II (with UNG) kullanıldı (Tablo 3-3).

Tablo 3-3. Real-Time PCR için karışım bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Birim Miktar (µl)
Nuclease-free water	7,67
Taqman Universal Master Mix II, with UNG	10
TaqMan MicroRNA Assay (20X)	1
miRNA Reverse Transkriptaz Ürünü	1,33

Tabloda belirtildiği gibi miRNA'lara spesifik işaretli probalar kullanılarak karışımlar hazırlandı ve Real-Time PCR plakasına 18,67 'şer µl dağıtıldı. Bu işlemi takiben 1,33 µl miRNA reverse transkriptaz ürünü eklendi. Böylece her bir kuyucukta total hacim 20 µl oldu. Real-Time PCR için LightCycler 480 II (Roche) cihazı kullanıldı (Tablo 3-4).

Tablo 3-4. Real-Time PCR için inkübasyon koşulları

İnkübasyon Koşulları	50 °C.....2 dakika	
	95 °C.....10 dakika	
	95 °C 15 saniye	 45 döngü
	60 °C.....1 dakika	

Real-Time PCR yöntemiyle SIRT1 protein regülasyonunda rol oynayan miRNA genlerinin (miR-34a, miR-217, miR-9, miR-132 ve miR-181a) serum düzeyinde ekspresyonu incelendi. Bu çalışmada endojen kontrol olarak RNU6B kullanıldı. Her bir örnek için Real-Time PCR işlemi iki tekrarlı olacak şekilde yapılarak ortalama döngü eşik değerleri (Cycle threshold, Ct) hesaplandı. Rölatif kantitasyon (RQ) analizi delta delta Ct metodu kullanılarak belirtildi. Hasta ve kontrol gruplarına ait ortalama Ct değerleri alınarak ve RQ formülü uygulanarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplandı. $\log_2$ dönüştürülmüş ifade düzeyleri hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldı.

3.3.3. Serum SIRT1 Düzeylerinin Belirlenmesi

SIRT1 protein düzeyi daha önce ayrılan ve -80 °C’de muhafaza edilen serum örneklerinin ticari kitteki prosedüre göre çalışılması ile belirlendi. ELISA prosedürüne başlamadan önce kit ve serum örnekleri 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Yıkama solüsyonu distile su kullanılarak 1:30 oranında dilüe edildi. Kitteki prosedüre uygun olarak standartlar hazırlandı.

ELISA plakasının standart kuyularına 50’şer µl standart eklendi. Örnek kuyularına ise önce 40’ar µl serum ve daha sonra 10’ar µl biotin ile konjuge edilmiş anti-SIRT1 antikoru eklendi. Bu işlemi takiben standart ve örnek kuyularına (blank hariç) 50 µl Streptavidin-HRP eklendi ve solüsyonların karışması sağlandı. Plaka bir kapatıcı ile kapatılarak 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plakanın üzerinde bulunan kapatıcı kaldırıldı ve kuyular boşaltıldı. Daha sonra plaka yıkama solüsyonu ile 5 kez (her bir kuyu için 350 µl yıkama solüsyonu olacak şekilde) yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında her bir kuyuya önce 50 µl substrat solüsyonu A ve sonra 50 µl substrat solüsyonu B eklendi, plaka yeni bir kapatıcı ile kapatılarak 37 °C’de 10

dakika süre ile karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Daha sonra reaksiyonun sonlanması için her bir kuyuya 50 µl stop solüsyonu eklendi ve hemen mavi renk sarıya dönüştü. 10 dakika içinde ELISA plaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda absorbanlar okutuldu. Standart eğri grafiği kullanılarak serum örneklerindeki SIRT1 protein düzeyleri hesaplandı. Serum SIRT1 düzeyleri hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldı.

3.3.4. Analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 18 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak alınmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmede gruplar arası demografik ve klinik bilgiler Ki-kare, Fisher's Exact ve Student t testleri ile incelenirken miRNA ifade düzeyleri ve SIRT1 protein düzeyleri Student t testi ile incelenmiştir. Grup içi SIRT1 ve diğer parametreler arasındaki korelasyon için Pearson Correlation ve diyabetik risk faktörlerinin analizlerinde Mann-Whitney testi kullanılmıştır. Kontrol gruplarında yapılan karşılaştırmalı analizler için ise Student t testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya birinci grupta Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Polikliniğine başvurmuş ve tip 2 diyabet tanısı konulmuş 25 birey ve ikinci grupta ise kontrol olarak kullanılmak üzere tip 2 diyabet hastalığı olmayan 25 birey dahil edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4.1. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONRASINDA ELDE EDİLEN BULGULAR

Çalışma gruplarına ait demografik ve klinik bilgiler Tablo 4-1’de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede hasta grubunda açlık kan glukozu ($p<0,001$), HbA1c (glikozile hemoglobin HPLC ile) ($p<0,001$), HbA1c (IFCC) ($p<0,001$), gama glutamil transferaz (GGT) ($p=0,020$), beyaz kan hücresi (WBC) ($p=0,002$) ve C-reaktif protein (CRP) ($p=0,002$) düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu saptanırken kreatinin ($p=0,004$) ve sodyum ($p=0,006$) düzeylerinin anlamlı düşük olduğu belirlenmiştir. İki grup arasında lipid profilleri incelendiğinde total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-Kolesterol, total kolesterol/HDL kolesterol ve trigliserid düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Ayrıca, çalışma grupları arasında yaş, BMI, üre, total protein, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), folat, vitamin B12, 25-Hidroksi vitamin D, kırmızı kan hücresi (RBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT), platelet (PLT), ürik asit, sedim 1 h, sodyum, potasyum, kalsiyum ve glomerüler filtrasyon hızı (eGFR) düzeyleri bakımından da istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir ($p>0,05$).

Çalışma grupları sigara kullanımı ($p=0,012$), hipertansiyon ($p<0,001$) ve aile öyküsü ($p=0,050$) açısından değerlendirildiğinde hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlılık saptanırken düşük HDL ve hiperkolesterolemi açısından herhangi bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4-1. Çalışma gruplarına ait demografik ve klinik bilgiler

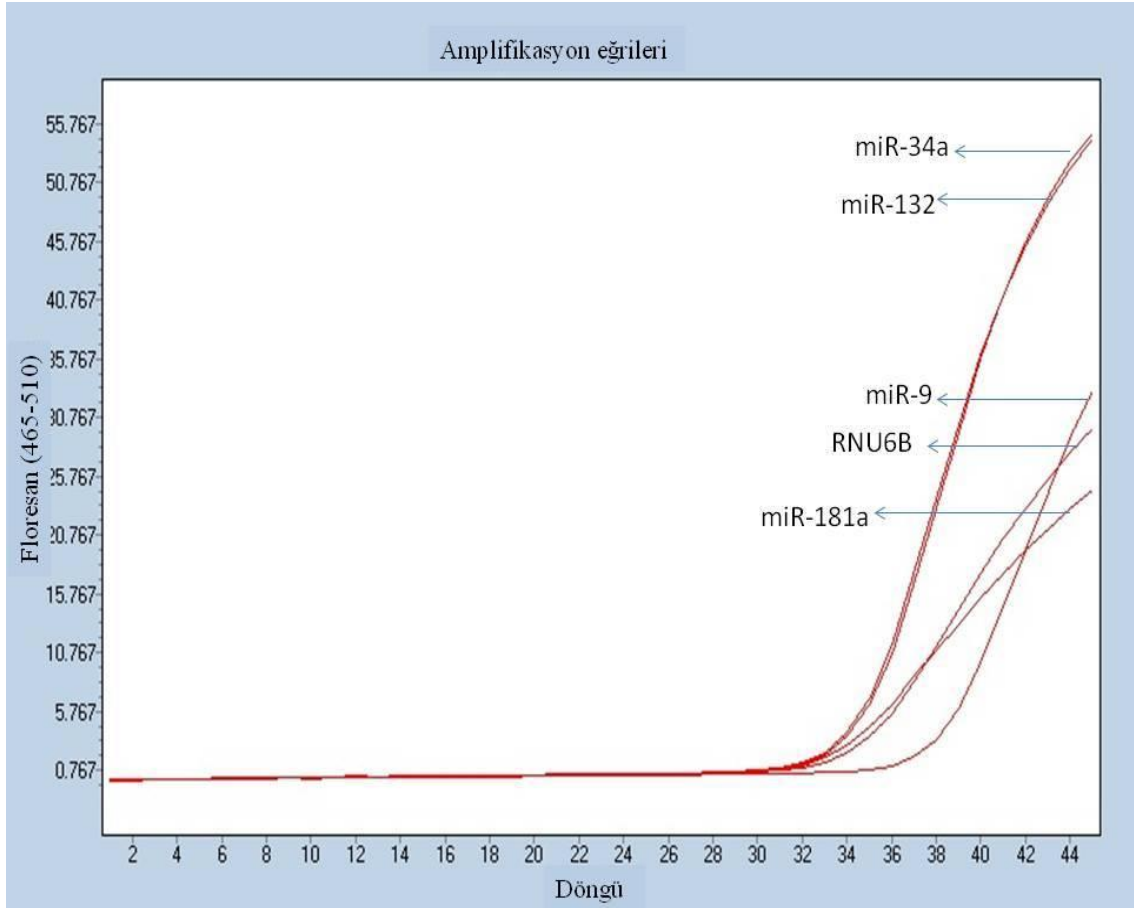
	Hasta grubu (n=25)	Kontrol grubu (n=25)
Cinsiyet (kadın/erkek)	21/4*	12/13
Yaş (yıl)	51,16±6,82	48,52±9,67
BMI (kg/m ²)	32,96±0,99	30,23±1,20
Açlık Kan Glukozu (mg/dL)	192,76±13,28*	98,00±2,35
HbA1c (glikozile hemoglobin HPLC ile) (%)	9,24±0,38*	5,74±0,06
HbA1c (IFCC) (mmol/molHb)	77,44±4,15*	39,28±0,68
Total Kolesterol (mg/dL)	204,52±10,10	189,84±9,98
LDL-Kolesterol (mg/dL)	116,28±8,25	113,44±7,96
HDL-Kolesterol (mg/dL)	50,24±2,93	45,36±2,48
Trigliserid (mg/dL)	183,92±16,00	156,76±14,90
Total Kolesterol/HDL Kolesterol	4,22±0,22	4,32±0,24
Üre (mg/dL)	28,28±1,34	30,67±1,70
Kreatinin (mg/dL)	0,64±0,03*	0,77±0,04
Total Protein (g/dL)	7,59±0,10	7,45±0,13
Albumin (g/dL)	4,34±0,07	4,47±0,06
AST (U/L)	26,92±4,77	24,96±2,48
ALT (U/L)	32,16±7,20	24,84±3,18
ALP (U/L)	93,06±7,98	77,17±3,80
GGT (U/L)	44,56±6,65*	28,11±2,68
Folat (ng/mL)	10,19±1,36	10,97±1,43
Vitamin B12 (pg/mL)	264,11±57,36	220,38±18,69
25-Hidroksi vitamin D (ng/mL)	12,18±3,94	15,32±2,32
WBC (10 ³ /uL)	8,67±0,31*	7,13±0,36
RBC (10 ⁶ /uL)	4,91±0,11	4,81±0,11

HGB (g/dL)	13,07±0,40	13,70±0,42
HCT (%)	38,99±0,79	40,23±1,03
PLT (10 ³ /uL)	290,55±13,31	258,79±8,22
Ürik asit (mg/dL)	5,43±0,37	5,53±0,26
Sedim 1 h (mm/saat)	30,20±7,01	15,58±3,13
Sodyum (mEq/L)	139,10±0,36*	140,61±0,38
Potasyum (mEq/L)	4,68±0,08	4,60±0,09
Kalsiyum (mg/dL)	9,66±0,08	9,53±0,07
eGFR (mL/dk/1.73)	104,12±2,23	100,80±2,62
CRP (mg/L)	7,49±1,36*	3,07±0,55
Diyabet Süresi (yıl)	8,92±0,90	-
Sigara (evet) (%)	4,5*	36
Hipertansiyon (evet) (%)	54,5*	0
Aile Öyküsü (evet) (%)	73,9*	45,8
Düşük HDL (evet) (%)	20	36
Hiperkolesterolemi (evet) (%)	52	40

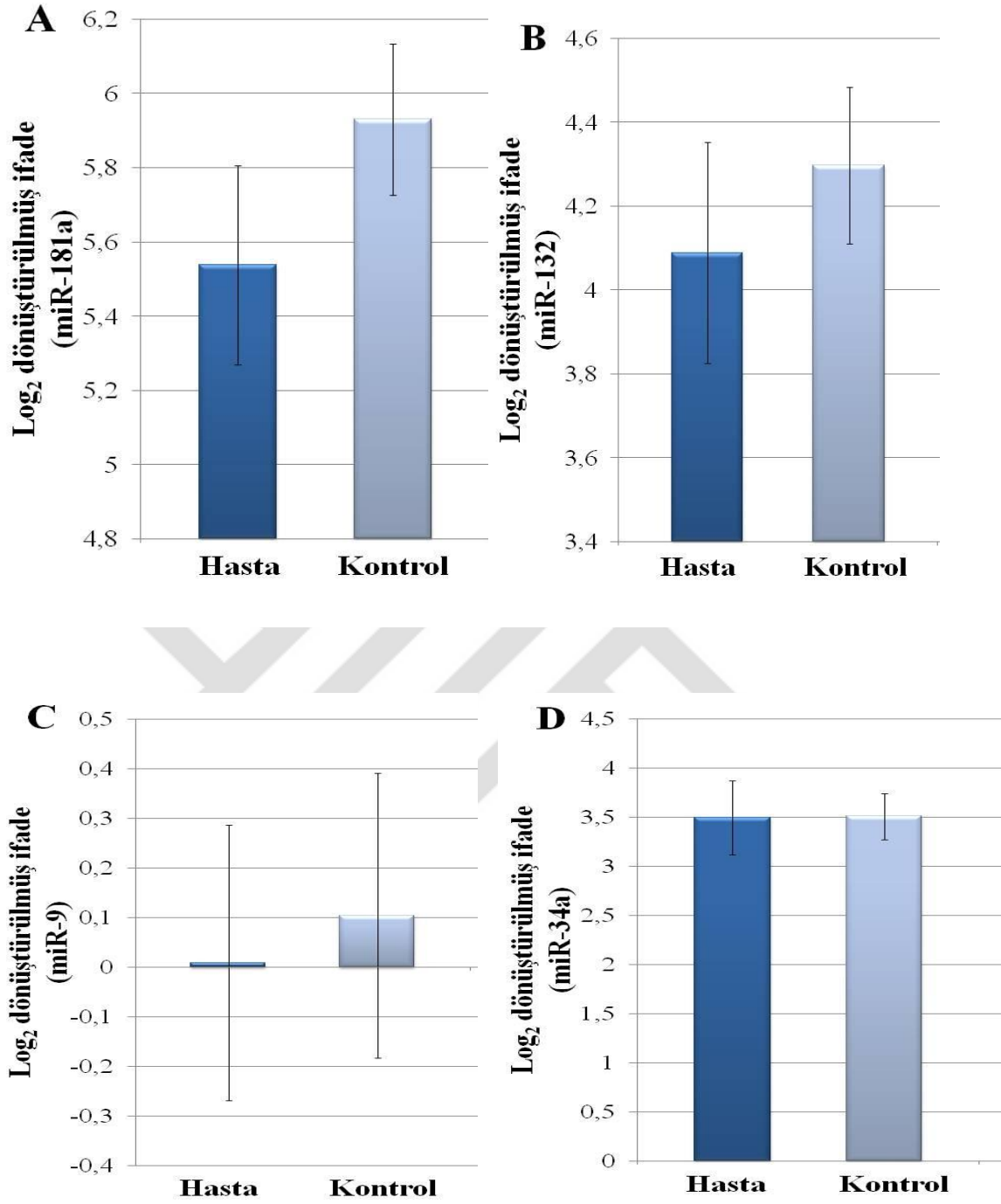
n: Birey sayısı, BMI: Vücut kitle indeksi, HbA1c: Glikozillenmiş hemoglobin, HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, IFCC: Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıp Federasyonu, LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein, HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein, AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, ALP: Alkalen fosfataz, GGT: Gama glutamil transferaz, WBC: Beyaz kan hücresi, RBC: Kırmızı kan hücresi, HGB: Hemoglobin, HCT: Hematokrit, PLT: Platelet, eGFR: Glomerüler filtrasyon hızı, CRP: C-reaktif protein.

Tablodaki değerler $\bar{X} \pm \text{SEM}$ olarak verilmiştir. Gruplar arası farklılık Ki-kare, Fisher's Exact ve Student t testleri ile incelenmiştir. *p<0,05.

Analiz edilen miRNA'lara ait amplifikasyon eğrileri Şekil 4-1'de gösterilmiştir. miR-217 ifade düzeyi istatistiksel analiz yapılacak kadar örnekte saptanmadığından analize dahil edilmemiştir. Hasta ve kontrol grupları arasında miR-181a, miR-132, miR-9 ve miR-34a ifade düzeyleri incelendiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4-2).



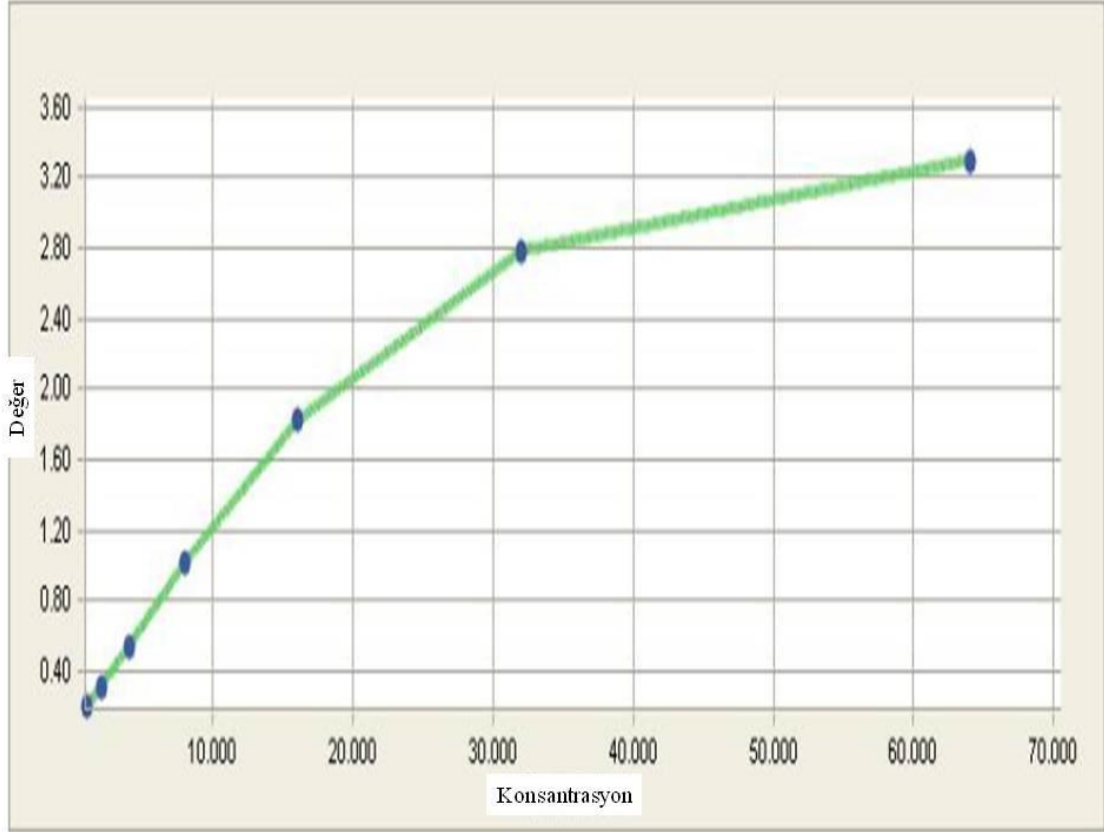
Şekil 4-1. Analiz edilen miRNA'lara ait amplifikasyon eğrileri



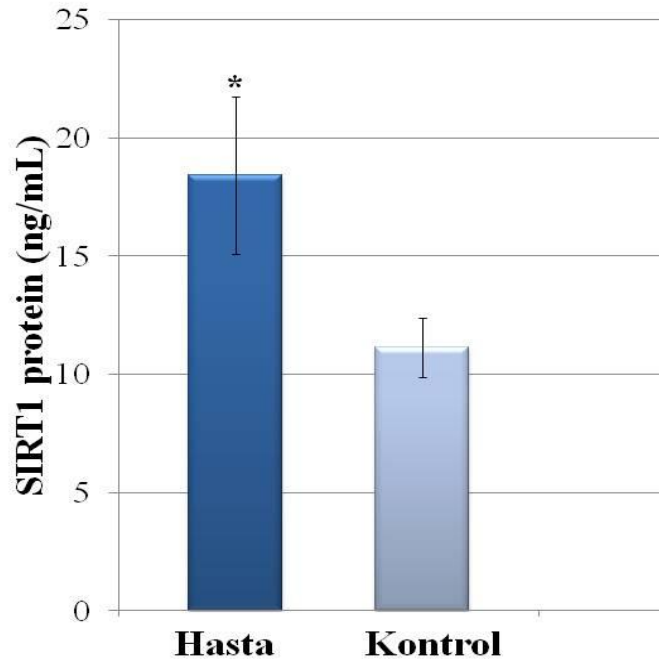
Şekil 4-2. Hasta ve kontrol gruplarında miRNA ifade düzeyleri (A. miR-181a, B. miR-132, C. miR-9 ve D. miR-34a)

Şekildeki değerler $\bar{X} \pm \text{SEM}$ olarak verilmiştir. Gruplar arası farklılık Student t testi ile incelenmiştir. $p > 0,05$.

SIRT1 protein düzeyini incelemek için yapılan ELISA deneyine ait standart eğrisi Şekil 4-3’de gösterilmiştir. Yapılan değerlendirmede hasta grubunda SIRT1 düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=0,044$) (Şekil 4-4).



Şekil 4-3. ELISA deneyine ait standart eğrisi



Şekil 4-4. Hasta ve kontrol gruplarında serum SIRT1 düzeyleri

SIRT1: Sirtuin 1.

Şekildeki değerler $\bar{X} \pm \text{SEM}$ olarak verilmiştir. Gruplar arası farklılık Student t testi ile incelenmiştir. * $p < 0,05$.

SIRT1 proteini ile diğer parametreler arasındaki ilişki incelendiğinde hasta grubunda SIRT1'in miR-181a ($r = -0,558$, $p = 0,005$) ve miR-132 ($r = -0,435$, $p = 0,034$) ile anlamlı olarak negatif korelasyon gösterdiği bulunurken miR-9, miR-34a, yaş, açlık kan glukozu, total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserid, HbA1c, total kolesterol/HDL kolesterol, üre, kreatinin, albumin, total protein, AST, ALT, ALP, GGT ve BMI ile anlamlı bir korelasyonu saptanmamıştır ($p > 0,05$). Kontrol grubunda ise SIRT1'in açlık kan glukozu ($r = -0,414$, $p = 0,040$) ile anlamlı olarak negatif korelasyon gösterdiği belirlenirken diğer parametreler açısından herhangi bir anlamlı korelasyon tespit edilmemiştir ($p > 0,05$) (Tablo 4-2).

Tablo 4-2. Serum SIRT1 ve diğer parametreler arasındaki korelasyon

	Hasta grubu (n=25)		Kontrol grubu (n=25)	
	r	p	r	p
miR-181a	-0,558	0,005*	0,115	0,586
miR-132	-0,435	0,034*	-0,114	0,589
miR-9	-0,381	0,066	-0,136	0,517
miR-34a	-0,214	0,315	-0,320	0,118
Yaş (yıl)	-0,163	0,447	-0,073	0,727
Açlık Kan Glukozu (mg/dL)	-0,125	0,562	-0,414	0,040*
Total Kolesterol (mg/dL)	-0,243	0,253	-0,074	0,725
LDL-Kolesterol (mg/dL)	-0,186	0,385	-0,010	0,962
HDL-Kolesterol (mg/dL)	-0,044	0,840	-0,099	0,636
Trigliserid (mg/dL)	-0,250	0,239	-0,144	0,494
HbA1c (mmol/molHb)	-0,362	0,082	-0,234	0,261
Total Kolesterol/HDL Kolesterol	-0,162	0,450	0,000	1,000
Üre (mg/dL)	0,093	0,666	0,134	0,524
Kreatinin (mg/dL)	0,041	0,850	-0,207	0,322
Albumin (g/dL)	0,358	0,158	-0,007	0,979
Total Protein (g/dL)	0,080	0,838	-0,045	0,884
AST (U/L)	-0,049	0,823	-0,105	0,618
ALT (U/L)	-0,034	0,873	-0,014	0,948
ALP (U/L)	-0,279	0,278	0,074	0,769
GGT (U/L)	-0,184	0,495	-0,050	0,840
BMI (kg/m ²)	-0,096	0,655	0,160	0,455

n: Birey sayısı, LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein, HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein, HbA1c: Glikozillenmiş hemoglobin, AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, ALP: Alkalen fosfataz, GGT: Gama glutamil transferaz, BMI: Vücut kitle indeksi.

Grup içi farklılıklar Pearson Correlation ile incelenmiştir. *p<0,05.

Yapılan değerlendirmede hasta grubunda miR-181a'nın miR-132 ($r=0,826$, $p<0,001$), miR-9 ($r=0,434$, $p=0,030$), miR-34a ($r=0,603$, $p=0,001$) ve trigliserid ($r=0,494$, $p=0,012$) ile ve miR-132'nin miR-9 ($r=0,412$, $p=0,041$), miR-34a ($r=0,792$, $p<0,001$) ve HbA1c ($r=0,443$, $p=0,027$) ile pozitif korelasyon gösterdikleri belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise miR-181a'nın kreatinin ($r=-0,489$, $p=0,013$) ile negatif korelasyon gösterdiği bulunurken miR-132'nin miR-34a ($r=0,688$, $p<0,001$) ve miR-181a ($r=0,565$, $p=0,003$) ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir.

Ayrıca, miR-34a'nın hasta grubunda AST ($r=0,631$, $p=0,001$), ALT ($r=0,698$, $p<0,001$) ve GGT ($r=0,605$, $p=0,013$) ile ve kontrol grubunda ise AST ($r=0,550$, $p=0,004$) ve ALT ($r=0,434$, $p=0,030$) ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır (Tablo 4-3, Tablo 4-4, Tablo 4-5 ve Tablo 4-6).

Tablo 4-3. Serum miR-181a ve diğer parametreler arasındaki korelasyon

	Hasta grubu (n=25)		Kontrol grubu (n=25)	
	r	p	r	p
SIRT1 protein (ng/mL)	-0,558	0,005*	0,115	0,586
miR-132	0,826	0,000*	0,565	0,003*
miR-9	0,434	0,030*	0,152	0,468
miR-34a	0,603	0,001*	0,131	0,532
Yaş (yıl)	0,238	0,251	0,108	0,607
Açlık Kan Glukozu (mg/dL)	0,230	0,269	-0,137	0,514
Total Kolesterol (mg/dL)	0,286	0,166	0,100	0,633
LDL-Kolesterol (mg/dL)	0,122	0,561	0,047	0,825
HDL-Kolesterol (mg/dL)	0,052	0,806	0,173	0,408
Trigliserid (mg/dL)	0,494	0,012*	0,052	0,804
HbA1c (mmol/molHb)	0,333	0,104	0,064	0,762
Total Kolesterol/HDL Kolesterol	0,218	0,296	-0,101	0,630
Üre (mg/dL)	0,221	0,288	-0,234	0,261
Kreatinin (mg/dL)	-0,152	0,468	-0,489	0,013*
Albumin (g/dL)	-0,319	0,212	0,025	0,919
Total Protein (g/dL)	-0,396	0,292	-0,141	0,645
AST (U/L)	0,031	0,887	-0,246	0,235
ALT (U/L)	0,140	0,505	-0,305	0,139
ALP (U/L)	0,262	0,310	0,054	0,831
GGT (U/L)	0,226	0,399	-0,238	0,327
BMI (kg/m ²)	0,096	0,650	-0,261	0,219

n: Birey sayısı, SIRT1: Sirtuin 1, LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein, HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein, HbA1c: Glükosillenmiş hemoglobin, AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, ALP: Alkalen fosfataz, GGT: Gama glutamil transferaz, BMI: Vücut kitle indeksi.

Grup içi farklılıklar Pearson Correlation ile incelenmiştir. *p<0,05.

Tablo 4-4. Serum miR-132 ve diğer parametreler arasındaki korelasyon

	Hasta grubu (n=25)		Kontrol grubu (n=25)	
	r	p	r	p
SIRT1 protein (ng/mL)	-0,435	0,034*	-0,114	0,589
miR-181a	0,826	0,000*	0,565	0,003*
miR-9	0,412	0,041*	0,313	0,128
miR-34a	0,792	0,000*	0,688	0,000*
Yaş (yıl)	0,090	0,668	0,022	0,917
Açlık Kan Glukozu (mg/dL)	0,343	0,094	-0,236	0,255
Total Kolesterol (mg/dL)	0,201	0,336	0,026	0,901
LDL-Kolesterol (mg/dL)	0,148	0,479	-0,038	0,858
HDL-Kolesterol (mg/dL)	-0,031	0,884	0,026	0,900
Trigliserid (mg/dL)	0,214	0,305	0,148	0,479
HbA1c (mmol/molHb)	0,443	0,027*	0,016	0,940
Total Kolesterol/HDL Kolesterol	0,199	0,341	0,012	0,954
Üre (mg/dL)	0,175	0,402	-0,087	0,678
Kreatinin (mg/dL)	-0,085	0,687	0,048	0,822
Albumin (g/dL)	-0,231	0,371	0,120	0,625
Total Protein (g/dL)	-0,472	0,200	0,051	0,868
AST (U/L)	0,128	0,551	0,242	0,243
ALT (U/L)	0,206	0,323	0,152	0,468
ALP (U/L)	0,378	0,135	0,052	0,838
GGT (U/L)	0,288	0,280	0,120	0,625
BMI (kg/m ²)	0,056	0,790	0,002	0,992

n: Birey sayısı, SIRT1: Sirtuin 1, LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein, HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein, HbA1c: Glükosillenmiş hemoglobin, AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, ALP: Alkalen fosfataz, GGT: Gama glutamil transferaz, BMI: Vücut kitle indeksi.

Grup içi farklılıklar Pearson Correlation ile incelenmiştir. *p<0,05.

Tablo 4-5. Serum miR-9 ve diğer parametreler arasındaki korelasyon

	Hasta grubu (n=25)		Kontrol grubu (n=25)	
	r	p	r	p
SIRT1 protein (ng/mL)	-0,381	0,066	-0,136	0,517
miR-181a	0,434	0,030*	0,152	0,468
miR-132	0,412	0,041*	0,313	0,128
miR-34a	0,213	0,306	-0,042	0,840
Yaş (yıl)	0,034	0,872	-0,140	0,504
Açlık Kan Glukozu (mg/dL)	0,130	0,536	0,043	0,838
Total Kolesterol (mg/dL)	0,298	0,149	-0,212	0,308
LDL-Kolesterol (mg/dL)	0,316	0,124	-0,292	0,157
HDL-Kolesterol (mg/dL)	-0,038	0,858	-0,233	0,262
Trigliserid (mg/dL)	0,059	0,779	0,246	0,236
HbA1c (mmol/molHb)	0,292	0,157	-0,047	0,823
Total Kolesterol/HDL Kolesterol	0,275	0,183	0,042	0,843
Üre (mg/dL)	0,312	0,129	0,044	0,836
Kreatinin (mg/dL)	-0,134	0,524	0,268	0,196
Albumin (g/dL)	-0,205	0,430	-0,060	0,808
Total Protein (g/dL)	-0,216	0,578	-0,393	0,184
AST (U/L)	-0,083	0,699	-0,090	0,670
ALT (U/L)	-0,094	0,656	-0,092	0,660
ALP (U/L)	-0,113	0,666	0,201	0,424
GGT (U/L)	-0,036	0,895	0,042	0,865
BMI (kg/m ²)	0,022	0,918	-0,240	0,258

n: Birey sayısı, SIRT1: Sirtuin 1, LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein, HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein, HbA1c: Glükosillenmiş hemoglobin, AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, ALP: Alkalen fosfataz, GGT: Gama glutamil transferaz, BMI: Vücut kitle indeksi.

Grup içi farklılıklar Pearson Correlation ile incelenmiştir. *p<0,05.

Tablo 4-6. Serum miR-34a ve diğer parametreler arasındaki korelasyon

	Hasta grubu (n=25)		Kontrol grubu (n=25)	
	r	p	r	p
SIRT1 protein (ng/mL)	-0,214	0,315	-0,320	0,118
miR-181a	0,603	0,001*	0,131	0,532
miR-132	0,792	0,000*	0,688	0,000*
miR-9	0,213	0,306	-0,042	0,840
Yaş (yıl)	-0,121	0,564	0,211	0,312
Açlık Kan Glukozu (mg/dL)	0,151	0,470	-0,098	0,641
Total Kolesterol (mg/dL)	0,227	0,275	0,067	0,750
LDL-Kolesterol (mg/dL)	0,167	0,424	0,059	0,778
HDL-Kolesterol (mg/dL)	0,186	0,374	0,023	0,914
Trigliserid (mg/dL)	0,054	0,796	0,034	0,870
HbA1c (mmol/molHb)	0,223	0,283	-0,065	0,758
Total Kolesterol/HDL Kolesterol	0,039	0,852	0,043	0,839
Üre (mg/dL)	0,080	0,704	-0,171	0,414
Kreatinin (mg/dL)	-0,133	0,526	0,031	0,883
Albumin (g/dL)	-0,030	0,909	0,003	0,990
Total Protein (g/dL)	-0,120	0,758	0,278	0,357
AST (U/L)	0,631	0,001*	0,550	0,004*
ALT (U/L)	0,698	0,000*	0,434	0,030*
ALP (U/L)	0,469	0,058	0,004	0,987
GGT (U/L)	0,605	0,013*	0,180	0,461
BMI (kg/m ²)	0,122	0,561	0,377	0,069

n: Birey sayısı, SIRT1: Sirtuin 1, LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein, HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein, HbA1c: Glikoillenmiş hemoglobin, AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, ALP: Alkalen fosfataz, GGT: Gama glutamil transferaz, BMI: Vücut kitle indeksi.

Grup içi farklılıklar Pearson Correlation ile incelenmiştir. *p<0,05.

Hasta ve kontrol gruplarına ait SIRT1 proteini ve miRNA (miR-181a, miR-132, miR-9 ve miR-34a) ifade düzeyleri sigara, cinsiyet, düşük HDL, hiperkolesterolemi ve aile öyküsü gibi parametreler açısından değerlendirildiğinde kontrol grubunda cinsiyetin miR-9 ifadesini etkilediği ($p=0,023$) saptanırken hasta grubunda istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Bir başka deyişle, hasta grubunda cinsiyetin kadın veya erkek olması, hiperkolesterolemi ve aile öyküsünün olup olmaması, sigaranın kullanılıp kullanılmadığı veya HDL düzeyinin düşük olup olmasının SIRT1 ve miRNA ekspresyonlarını etkilemediği görülmüştür.

Kontrol grubunda cinsiyete göre SIRT1 proteini ve miRNA'ların (miR-181a, miR-132, miR-9 ve miR-34a) ifade düzeyleri incelendiğinde kadınlarda miR-9 ifade düzeyinin erkeklere göre anlamlı olarak azaldığı ($p=0,033$) belirlenirken SIRT1, miR-181a, miR-132 ve miR-34a açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-7).

Tablo 4-7. Kontrol grubunda cinsiyete göre SIRT1 proteini ve miRNA ifade düzeyleri

	Kadın (n=12)	Erkek (n=13)
SIRT1 düzeyi (ng/ml)	11,69±1,85	10,63±1,81
miR-181a	6,08±0,33	5,80±0,25
miR-132	4,19±0,30	4,40±0,23
miR-9	-0,52±0,25*	0,68±0,46
miR-34a	3,73±0,40	3,30±0,26

SIRT1: Sirtuin 1.

n: Birey sayısı. Tablodaki değerler $X \pm SEM$ olarak verilmiştir. Gruplar arası farklılık Student t testi ile incelenmiştir.

* $p<0,05$.

Kontrol grubunda sigara kullanan ve kullanmayan bireyler arasında SIRT1 proteini ve miRNA'ların (miR-181a, miR-132, miR-9 ve miR-34a) ifade düzeyleri incelendiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4-8).

Tablo 4-8. Kontrol grubunda sigara kullanan ve kullanmayanlar arasında SIRT1 proteini ve miRNA ifade düzeyleri

	Sigara kullananlar (n=9)	Sigara kullanmayanlar (n=16)
SIRT1 düzeyi (ng/ml)	9,13±0,37	12,26±1,94
miR-181a	6,02±0,27	5,88±0,28
miR-132	4,24±0,34	4,33±0,23
miR-9	0,14±0,57	0,09±0,33
miR-34a	3,34±0,31	3,60±0,33

SIRT1: Sirtuin 1.

n: Birey sayısı. Tablodaki değerler $\bar{X} \pm \text{SEM}$ olarak verilmiştir. Gruplar arası farklılık Student t testi ile incelenmiştir. $p>0,05$.

5. TARTIŞMA

Diyabet, insülin sekresyonu ve/veya insülin etkisindeki kusurlardan kaynaklanan ve hiperglisemi ile karakterize edilen bir metabolik hastalık grubudur ve insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Dünya genelinde 415 milyon insan diyabetli olarak yaşamaktadır ve tahmini olarak tanı konulmamış 193 milyon diyabetli insan bulunmaktadır. WHO'ya göre ise dünya genelinde diyabet hastalığına yakalanmış 400 milyondan fazla insan bulunmakta olup bu sayının 2030'a kadar 552 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (1,3,5,23).

Diyabet birkaç çeşide sınıflandırılabilir, ancak diyabet vakalarının büyük çoğunluğunu T1DM ve T2DM oluşturmaktadır (3). Diyabetli hastaların %90'dan fazlasında görülen T2DM, insülin direnci ve insülin sekresyon bozukluğundan kaynaklanan metabolik bir hastalık olup kronik hiperglisemi ile karakterizedir. Patogenezinde aile öyküsü, yaşlanma, hareketsizlik ve obezite gibi risk faktörlerinin rol aldığı T2DM'nin gelişiminde pankreas, karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusunun katkısı oldukça önemlidir. Kronik hiperglisemi, böbrek, kalp, göz ve sinir sistemi gibi çeşitli organların işlev bozukluğuna yol açan uzun süreli mikro ve makrovasküler komplikasyonlar ile ilişkilidir. Kronik diyabetik komplikasyonların erken teşhisi ise bu farklı organların işlev bozukluğunu önlemek için son derece önemlidir (2,4,5,18,32).

NAD⁺ bağımlı olarak görev yapan SIRT ailesine ait genler ilk olarak mayada ve daha sonra bakterilerde, sineklerde, solucanlarda, bitkilerde ve memelilerde tanımlanmıştır. NAD⁺ bağımlı deasetilaz ve/veya ADP-ribozil transferaz aktiviteleri bulunan SIRT genlerinin memelilerde 7 varyantı (SIRT1-SIRT7) bulunmaktadır ve bu genler SIRT enzimlerini eksprese etmektedirler. SIRT ailesine ait 7 gen arasında en dayanıklı deasetilaz aktivitesine sahip olan gen ise SIRT1'dir ve bu gen çekirdek ve sitoplazmada lokalize olmaktadır (6,8-11,12). Posttranslasyonel modifikasyonlardaki asetilasyon ve deasetilasyon arasındaki dengeyi sağlamaya yardımcı olan SIRT1 proteini sınıf I histon deasetilaz olarak görev yapmaktadır (Pubmed,13). Ayrıca, transkripsiyon faktörü ve kofaktör olarak görev yapan SIRT1 proteini gen ifadesinin düzenlenmesini ve kromatin şekillenmesini sağlamakta olup biyolojik sistemde oldukça önemli bir rol oynamaktadır. SIRT1 gen ifadesinin düzenlenmesinin yanında glukoz ve lipid metabolizması, mitokondriyal biyogenez, inflamasyon, otofaji, sirkadiyen ritim,

apoptoz ve stres direnci gibi birçok hücrel fonksiyonu da düzenlemektedir (6,10,81). Glukoz ve lipid metabolizmasında oldukça önemli olan SIRT1, pankreasta β hücrelerinin korunmasını ve insülin salgılanmasını, karaciğerde glukoneogenezi ve yağ asidi oksidasyonunu, yağ dokuda lipid mobilizasyonunu ve iskelet kasında ise mitokondriyal biyogenezi ve glukoz alımını arttırır. Mitokondride ROS'ların üretimini azaltırken biyogenezi ve yağ asidi oksidasyonunu düzenler (6,14,15).

miRNA'lar transkripsiyonu olan fakat translasyonu gerçekleştirmeyen küçük, tek sarmallı ve 21-24 nükleotid uzunluğunda olan fonksiyonel RNA molekülleridir. Genel olarak bir veya birden fazla hedef geni baskılayarak translasyonun engellenmesine ve/veya ilgili mRNA'nın yıkılmasına neden olurlar. Hedef mRNA'lara etki ederek ilgili genlerin ekspresyonlarını regüle ederler. Ayrıca, hücrel gelişim, farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerde önemli rol oynarlar (16,17). β -hücre sağkalımı ve apoptoz, β -hücre proliferasyonu, β -hücre farklılaşması ve özellikle insülin sekresyonunun regülasyonu üzerinden β -hücrelerini etkilerler (132). Son zamanlarda miRNA'ların hücreler tarafından salgılanabildiği, böylece serumda ve diğer biyolojik sıvılarda saptanabildiği gösterilmiştir. Özellikle hiperglisemi ile karakterize olan T2DM ile ilgili miRNA'ların belirlenmesi amacıyla tüm kan, serum, plazma, idrar, periferik kan mononükleer hücreler ve endotelial progenitor hücreler üzerinde bir takım çalışmalar yapılmış ve ilgili miRNA'lar incelenmiştir (18,19).

T2DM ve SIRT1 ekspresyonunun nasıl düzenlendiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır ancak yapılan çalışmalarda miRNA'ların SIRT1 ekspresyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir. Bazı özel miRNA'ların bol miktarda ve stabil olarak serumda var oldukları ve potansiyel olarak hastalığa spesifik oldukları belirtilmiştir. Dolaşımdaki miRNA'lar T2DM öngörüsü veya hastalık ilerlemesi için yeni biyobelirteçler olarak önerilmiş ve serum miRNA'larının T2DM için yeni biyobelirteçler olabileceği belirlenmiştir. miR-34a, miR-181a, miR-132, miR-146, miR-143, miR-9 ve miR-217 gibi miRNA'ların karaciğer, pankreas, yağ doku ve endotel hücreleri gibi birçok hücre/dokuda SIRT1'i hedefleyerek lipid metabolizması, karaciğer yağlanması, glukoz homeostazı, hepatik insülin sinyalizasyonu, insülin sekresyonu, β hücre apoptozu, adiposit farklılaşması ve endotelial hücre yaşlanmasını içeren birçok hücrel işlevde önemli rol oynadıkları literatürden bilinmektedir (22,156,162-186,198,199).

Bu tez çalışmasında SIRT1 ve SIRT1 protein regülasyonunda rol oynayan miRNA genlerinin (miR-34a, miR-217, miR-9, miR-132 ve miR-181a) Türk diyabetik hastalardaki etkileri Real-Time PCR ve ELISA yöntemleri kullanılarak incelenmiştir.

T2DM'nin tanısını koymak için kan glukoz ölçümü ve HbA1c gibi testlerin yapılması ve sonuçların varsa belirtiler ve komplikasyonlar ile birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (4). Bu nedenle T2DM patogenezinin yönelik yapılan çalışmalarda gruplar arasında değerlendirilen demografik ve biyokimyasal parametreler oldukça önem taşımaktadır.

Normal glukoz toleranslı 20 (NGT, yaş: $46,65 \pm 16,181$), prediyabetik 20 (yaş: $52,63 \pm 11,251$) ve T2DM'li 24 (yaş: $51,13 \pm 9,214$) olmak üzere toplam 64 bireyde yapılan bir çalışmada gruplar arasında yaş ve BMI açısından anlamlı bir fark saptanmazken ($p > 0,05$) HbA1c seviyelerinin prediyabetik ($p = 0,003$) ve T2DM gruplarında ($p < 0,0001$) NGT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu tespit edilmiştir. Serum lipid düzeyleri (total kolesterol, trigliserid, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol) gruplar arasında karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$) (200).

18 T2DM hastası (n-T2D, yaş: $47,33 \pm 2,617$), bozulmuş glukoz toleransı ve/veya bozulmuş açlık glukozu bulunan 19 prediyabetik birey (yaş: $49,32 \pm 2,817$) ve normal glukoz toleranslı T2DM'ye yatkın 19 birey (s-NGT, yaş: $41,00 \pm 2,616$) olmak üzere 56 bireyin dahil edildiği bir çalışmada ise 3 grup arasında cinsiyet dağılımı, yaş ve BMI açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$). Total kolesterol açısından anlamlı bir fark bulunmazken ($p > 0,05$) trigliserid düzeyinin s-NGT'den n-T2D'ye doğru aşamalı ve anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ($p < 0,01$) (201).

Bu tez çalışmasında 25 T2DM (yaş: $51,16 \pm 6,82$) ve 25 kontrol (yaş: $48,52 \pm 9,67$) grubu birey ile çalışılmış olup yapılan değerlendirmede hasta grubunda açlık kan glukozu ($p < 0,001$), HbA1c (glikozile hemoglobin HPLC ile) ($p < 0,001$), HbA1c (IFCC) ($p < 0,001$), GGT ($p = 0,020$), WBC ($p = 0,002$) ve CRP ($p = 0,002$) düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu saptanırken kreatinin ($p = 0,004$) ve sodyum ($p = 0,006$) düzeylerinin anlamlı düşük olduğu belirlenmiştir. İki grup arasında lipid profilleri incelendiğinde ise total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, total kolesterol/HDL kolesterol ve trigliserid düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ayrıca, çalışma grupları arasında yaş, BMI, üre, total

protein, AST, ALT, ALP, folat, vitamin B12, 25-Hidroksi vitamin D, RBC, HGB, HCT, PLT, ürik asit, sedim 1 h, sodyum, potasyum, kalsiyum ve eGFR düzeyleri bakımından da istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir ($p>0,05$).

Gruplar arasında özellikle yaş, BMI ve lipid parametreleri açısından herhangi bir istatistiksel anlamlılık saptanmaması birbirine benzer gruplar ile çalışıldığını göstermekte olup hasta grubunda özellikle açlık kan glukozu ve HbA1c düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olması T2DM patogenezi destekleyici niteliktedir.

T2DM patogenezinin aydınlatılmasında klinik bulguların yanı sıra gen ve protein değişiklikleri de oldukça önemlidir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda T2DM ile ilişkili olabilecek gen ve proteinler moleküler düzeyde araştırılmaktadır.

SIRT1, glukoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde görev yapan bir sirtuindir. Pankreasta β hücrelerinin korunmasını ve insülin salgılanmasını, karaciğerde glukoneogenezi ve yağ asidi oksidasyonunu, yağ dokuda lipid mobilizasyonunu ve iskelet kasında ise mitokondriyal biyogenezi ve glukoz alımını artırır. Ayrıca, mitokondride ROS'ların üretimini azaltırken biyogenezi ve yağ asidi oksidasyonunu düzenler (6,14,15). miRNA'ların hedef mRNA'lara etki ederek ilgili genlerin ekspresyonlarını düzenlediği ise literatürden bilinmektedir (126).

Son zamanlarda T2DM'nin moleküler mekanizmasının aydınlatılması amacıyla serum SIRT1 ve ilgili miRNA'ların T2DM tanısı için biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelleri üzerine bir takım çalışmalar yapılmıştır.

Diyabetle ilgili serum miRNA'larının klinik önemini araştırmak amacıyla yeni tanı almış 18 T2DM'li hasta (n-T2D), bozulmuş glukoz toleransı ve/veya bozulmuş açlık glukozu bulunan 19 prediyabetik birey ve normal glukoz toleranslı T2DM'ye yatkın 19 birey (s-NGT) olmak üzere 56 bireyin dahil edildiği bir çalışmada serum miRNA'ları Real-Time PCR yöntemi ile incelenmiş olup yapılan analiz sonucunda s-NGT ve prediyabetik bireyler arasında miRNA ekspresyonu açısından anlamlı bir farklılık gözlenmezken ($p>0,05$) n-T2D'li bireylerde s-NGT ile karşılaştırıldığında çalışmaya dahil edilen miR-9 ($p=0,0410$), miR-29a ($p=0,0030$), miR-30d ($p=0,0180$), miR34a ($p=0,0000$), miR-124a ($p=0,0230$), miR146a ($p=0,0080$) ve miR375 ($p=0,0040$) olmak üzere 7 miRNA'nın ve prediyabetik grupla karşılaştırıldığında ise miR-9 ($p=0,0210$), miR-29a ($p=0,0030$), miR34a ($p=0,0010$), miR146a ($p=0,0100$) ve miR375

($p=0,0020$) olmak üzere 5 miRNA'nın anlamlı olarak upregüle olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, serum miRNA ekspresyon seviyelerinin T2DM'li hastalarda anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur (201).

T2DM'li hasta ($n=65$) ve sağlıklı kontrol ($n=65$) grubu bireylerin serum örneklerinde qRT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada hasta grubunda miR-34a ($p<0,05$) ve miR-34c ($p<0,01$) ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu bulunmuş olup miR-34a ve miR-34c'nin T2DM tanısı için biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeline sahip oldukları belirtilmiştir (202).

Real-Time PCR ile yapılan bir diğer çalışmada diyabetik hastaların ($n=20$) serum örneklerinde miR-181a seviyesinin kontrol grubuna ($n=20$) göre anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p<0,01$). miR-181a'nın SIRT1'i regüle ettiği ve hepatik insülin duyarlılığını geliştirdiği saptanırken miR-181a inhibisyonunun insülin direnci ve T2DM tedavisinde potansiyel yeni bir strateji olabileceği belirtilmiştir (22).

16-19 gebelik haftasında gestasyonel diyabeti (GDM) olan ($n=24$) ve olmayan ($n=24$) kadınlarda yapılan bir çalışmada qRT-PCR yöntemi kullanılmış ve yapılan değerlendirmenin sonucunda miR-132 ($p=0,042$), miR-29a ($p=0,032$) ve miR-222 ($p=0,041$) serum ekspresyon seviyelerinin GDM (+) grupta anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır (203).

Serum miR-217 ve albüminüri ile saptanan diyabetik böbrek hastalığının şiddeti arasındaki korelasyonun araştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada 495 T2DM ve 195 kontrol grubu bireyde serum miR-217 seviyeleri Real-Time PCR yöntemi ile ve serum SIRT1 seviyeleri ise ELISA yöntemi ile incelenmiş ve T2DM hastalarında kontrol grubuna göre SIRT1 ($p<0,01$) seviyelerinin anlamlı düşük olduğu tespit edilmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında serum miR-217 düzeylerinin T2DM'li hastalarda anlamlı olarak arttığı ($p<0,01$) belirlenmiştir. Azalmış serum SIRT1 seviyesinin Ln (ACR-albümin/kreatinin oranı) ile anlamlı olarak korelasyon gösterdiği saptanmıştır ($p<0,05$). Serum miR-217'nin ise diyabet süresi, HOMA-IR, glikatlı hemoglobin, Ln (ACR), LDL, total kolesterol, trigliserid, ürik asit, serum kreatinin ve kan üre azotu ile pozitif korelasyon ($p<0,05$) gösterirken serum SIRT1 ile negatif korelasyon ($p=0,002$) gösterdiği tespit edilmiş ve T2DM hastalarında proteinüri gelişimiyle ilişkili olabileceği ve ayrıca kronik inflamasyonu, böbrek fibrozisini ve anjiyogenezi teşvik ederek diyabetik böbrek hastalığının gelişiminde rol alabileceği belirtilmiştir (204).

80 T2DM hasta ve 20 kontrol grubu bireyde ELISA yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum SIRT1 seviyesinin normoalbuminürik grupta anlamlı düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Ayrıca, SIRT1'in normoalbuminürik hastalarında açlık kan glukozu ile pozitif korelasyon ($p<0,05$) gösterirken makroalbuminürik hastalarındaki mikroalbumin ile negatif korelasyon ($p<0,05$) gösterdiği belirlenmiş ve serum SIRT1'in tip 2 diyabetik nefropati hastalarında minimal böbrek yetmezliği ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (205).

Farklı evrelerde diyabetik nefropatiye sahip T2DM hastalarında serum SIRT1 değişikliklerinin yine ELISA yöntemi ile belirlendiği bir diğer çalışmada ise serum SIRT1 seviyelerinin T2DM'li hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı düşük olduğu ve idrar protein atılım oranının artmasıyla SIRT1 seviyelerinin normoalbuminürik, mikroalbuminürik ve makroalbuminürik gruplarında kademeli olarak azaldığı belirlenmiştir ($p<0,01$). Ayrıca, SIRT1'in Ln (ACR) ile anlamlı negatif ($p<0,01$) korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Serum SIRT1'in diyabetik nefropatinin tedavisinde yeni bir hedef olabileceği ve SIRT1 seviyelerinin arttırılmasının diyabetik nefropatinin ilerlemesini geciktirmede bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (206).

Bizim çalışmamızda ise hasta ve kontrol grupları arasında SIRT1 protein düzeyleri incelendiğinde hasta grubunda SIRT1 düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=0,044$). Özellikle SIRT1 protein seviyesinin hasta grubunda anlamlı yüksek çıkması diğer çalışmaların SIRT1 sonuçlarına zıt bir bulgu olma özelliğindedir. Türk diyabetik hastalarında SIRT1 seviyesinin yüksek çıkması vücuttaki bir kompensatör mekanizması olarak değerlendirilebilir.

Gen ekspresyon sonuçları analiz edildiğinde gruplar arasında miR-181a, miR-132, miR-9 ve miR-34a ifade düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

SIRT1 ile diğer parametreler arasındaki ilişki incelendiğinde ise SIRT1'in hasta grubunda miR-181a ($r=-0,558$, $p=0,005$) ve miR-132 ($r=-0,435$, $p=0,034$) ile ve kontrol grubunda açlık kan glukozu ($r=-0,414$, $p=0,040$) ile anlamlı olarak negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, yapılan değerlendirmede hasta grubunda miR-181a'nın miR-132 ($r=0,826$, $p<0,001$), miR-9 ($r=0,434$, $p=0,030$), miR-34a ($r=0,603$, $p=0,001$) ve trigliserid ($r=0,494$, $p=0,012$) ile ve miR-132'nin miR-9 ($r=0,412$,

$p=0,041$), miR-34a ($r=0,792$, $p<0,001$) ve HbA1c ($r=0,443$, $p=0,027$) ile pozitif korelasyon gösterdikleri saptanırken kontrol grubunda miR-181a'nın kreatinin ($r=-0,489$, $p=0,013$) ile negatif ve miR-132'nin miR-34a ($r=0,688$, $p<0,001$) ve miR-181a ($r=0,565$, $p=0,003$) ile pozitif korelasyon gösterdikleri tespit edilmiştir. miR-34a'nın ise hasta grubunda AST ($r=0,631$, $p=0,001$), ALT ($r=0,698$, $p<0,001$) ve GGT ($r=0,605$, $p=0,013$) ile ve kontrol grubunda AST ($r=0,550$, $p=0,004$) ve ALT ($r=0,434$, $p=0,030$) ile pozitif korelasyon göstererek karaciğer enzimleri üzerine etkide bulunduğu saptanmıştır.

Tüm bu sonuçlar bize özellikle miR-181a ve miR-132'nin diyabetik bireylerde SIRT1 ile ilişkili olduğunu, serum SIRT1 artışının hastalıkla ilişkili olabileceğini ve SIRT1'in Türk popülasyonunda T2DM için yeni noninvazif bir protein belirteci olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Diyabetik risk faktörleri açısından çalışma gruplarımız değerlendirildiğinde hasta grubunda hipertansiyon ($p<0,001$) ve aile öyküsünün ($p=0,050$) anlamlı yüksek olduğu, sigara kullanımının ($p=0,012$) ise anlamlı düşük olduğu belirlenmiş, ancak düşük HDL ve hiperkolesterolemi açısından herhangi bir anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Hasta ve kontrol gruplarına ait SIRT1 proteini ve miRNA ifade düzeyleri sigara, cinsiyet, düşük HDL, hiperkolesterolemi ve aile öyküsü gibi parametreler açısından değerlendirildiğinde ise kontrol grubunda cinsiyetin miR-9 ifadesini etkilediği ($p=0,023$) saptanırken hasta grubunda istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Bir başka deyişle, hasta grubunda cinsiyetin kadın veya erkek olması, hiperkolesterolemi ve aile öyküsünün olup olmaması, sigaranın kullanılıp kullanılmadığı veya HDL düzeyinin düşük olup olmasının SIRT1 ve miRNA ekspresyonlarını etkilemediği görülmüştür. Kontrol grubunda SIRT1 proteini ve miRNA'ların ifade düzeyleri sigara kullanan ve kullanmayan bireyler arasında incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken ($p>0,05$) cinsiyete göre incelendiğinde kadınlarda miR-9 ifade düzeyinin erkeklere göre anlamlı olarak azaldığı ($p=0,033$) belirlenmiştir.

Sonuç olarak,

Dolaşımdaki miRNA'lar ve ilgili proteinler T2DM gibi çeşitli metabolik hastalıkların erken teşhisi ve patogenezi için önemlidirler. Yapılan bu tez çalışmasında serum SIRT1 proteininin T2DM'nin patogenezinde önemli yeni bir biyobelirteç olma potansiyeline sahip olduğu saptanmıştır.

Bu çalışma, SIRT1'in Türk T2DM hastalarındaki etkisinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Çalışmamız Türk popülasyonunda serumdaki SIRT1 ve SIRT1 protein regülasyonunda rol oynayan miRNA'lar ile ilgili ilk verileri sunmuş olup bu verilerin ileride yapılacak olan çalışmalara öncülük edeceğine ve T2DM'nin moleküler mekanizmasının aydınlatılması konusunda yarar sağlayacağına inanmaktayız.

KAYNAKLAR

- 1.Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J* 2012 Jul; **27(4)**: 269–73.
- 2.Jin W, Patti ME. Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2009 Jan; **116(2)**: 99-111.
- 3.American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014 Jan; **37 Suppl 1**: S81-90.
- 4.Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (TEMED). Diabetes mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem klavuzu. 2017.
- 5.Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet* 2017 Jun 3; **389(10085)**: 2239-2251.
- 6.Kitada M, Kume S, Kanasaki K, et al. Sirtuins as possible drug targets in type 2 diabetes. *Curr Drug Targets* 2013 Jun 1; **14(6)**: 622-36.
- 7.NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* 2016 Apr 9; **387(10027)**: 1513-30.
- 8.Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, et al. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* 2002 Nov 22; **277(47)**: 45099-107.
- 9.Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 2007 May 15; **404(1)**: 1-13.
- 10.Bayram A, Igci M. Sirtuin Genleri ve İşlevleri. *Fırat Tıp Derg/Fırat Med J* 2013; **18(3)**: 136-140.
- 11.North BJ, Marshall BL, Borra MT, et al. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 2003 Feb; **11(2)**: 437-44.
- 12.Morris BJ. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic Biol Med* 2013 Mar; **56**: 133-71.
- 13.Michishita E, Park JY, Burneskis JM, et al. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 2005 Oct; **16(10)**: 4623-35.
- 14.Kitada M, Koya D. SIRT1 in Type 2 Diabetes: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Diabetes Metab J* 2013 Oct; **37(5)**: 315-25.

- 15.Perovic A, Unic A, Dumic J. Recreational scuba diving: negative or positive effects of oxidative and cardiovascular stress?. *Biochem Med (Zagreb)* 2014; **24(2)**: 235-47.
- 16.Karagun BS, Antmen B, Sasmaz I, et al. Mikro RNA ve Kanser. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2014; **12(1)**: 45-56.
- 17.Hitit M, Kurar E, Guzeloglu A. MikroRNA Biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg* 2015; **10(3)**: 211-218.
- 18.Sebastiani G, Nigi L, Spagnuolo I, et al. MicroRNA profiling in sera of patients with type 2 diabetes mellitus reveals an upregulation of miR-31 expression in subjects with microvascular complications. *J Biomedical Science and Engineering* 2013; **6**: 58-64.
- 19.Chien HY, Lee TP, Chen CY, et al. Circulating microRNA as a diagnostic marker in populations with type 2 diabetes mellitus and diabetic complications. *J Chin Med Assoc* 2015 Apr; **78(4)**: 204-11.
- 20.Menghini R, Casagrande V, Federici M. MicroRNAs in endothelial senescence and atherosclerosis. *J Cardiovasc Transl Res* 2013 Dec; **6(6)**: 924-30.
- 21.Yamakuchi M. MicroRNA Regulation of SIRT1. *Front Physiol* 2012 Mar 30; **3**: 68.
- 22.Zhou B, Li C, Qi W, et al. Downregulation of miR-181a upregulates sirtuin-1 (SIRT1) and improves hepatic insulin sensitivity. *Diabetologia* 2012 Jul; **55(7)**: 2032-43.
- 23.Piero MN, Nzaro GM, Njagi JM. Diabetes mellitus-a devastating metabolic disorder. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2014; **4(40)**: 1-7.
- 24.Ahmed AM. History of diabetes mellitus. *Saudi Med J* 2002 Apr; **23(4)**: 373–8.
- 25.Raghunathan K. History of diabetes from remote to recent times. *Bull Indian Inst Hist Med Hyderabad* 1976 Jul; **6(3)**: 167-82.
- 26.Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* 2017 Mar 30; **3**: 17016.
- 27.Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet* 2014; **383**: 69–82.
- 28.Sami W, Ansari T, Butt NS, et al. Effect of diet on type 2 diabetes mellitus: A review. *Int J Health Sci (Qassim)* 2017 Apr-Jun; **11(2)**: 65-71.
- 29.Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, et al. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci* 2014 Sep 6; **11(11)**: 1185-200.

- 30.American Diabetes Association. Screening for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004 Jan; **27 Suppl 1**: S11-4.
- 31.Ramachandran A. Know the signs and symptoms of diabetes. *Indian J Med Res* 2014 Nov; **140(5)**: 579-81.
- 32.Scheen AJ. Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clin Belg* 2003 Nov-Dec; **58(6)**: 335-41.
- 33.Kaku K. Pathophysiology of type 2 diabetes and its treatment policy. *JMAJ* 2010; **53(1)**: 41-46.
- 34.Pyke DA. Diabetes: the genetic connections. *Diabetologia* 1979 Dec; **17(6)**: 333-43.
- 35.Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Jani R, et al. The relationship between fasting hyperglycemia and insulin secretion in subjects with normal or impaired glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008 Aug; **295(2)**: E401-6.
- 36.Ozougwu JC, Obimba KC, Belonwu CD, et al. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Pathophysiol* 2013; **4(4)**: 46-57.
- 37.Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999 Sep; **22(9)**: 1462-70.
- 38.Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, et al. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 1992 Oct 17; **340(8825)**: 925-9.
- 39.Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, et al. Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1989 Aug 10; **321(6)**: 337-43.
- 40.Ducluzeau PH, Perretti N, Laville M, et al. Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* 2001 May; **50(5)**: 1134-42.
- 41.Vaag A, Henriksen JE, Beck-Nielsen H. Decreased insulin activation of glycogen synthase in skeletal muscles in young nonobese Caucasian first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992 Mar; **89(3)**: 782-8.
- 42.Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 2007 Apr; **87(2)**: 507-20.

- 43.Kottronen A, Seppala-Lindroos A, Bergholm R, et al. Tissue specificity of insulin resistance in humans: fat in the liver rather than muscle is associated with features of the metabolic syndrome. *Diabetologia* 2008 Jan; **51(1)**: 130-8.
- 44.Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003 Jan; **52(1)**: 102-10.
- 45.Wajchenberg BL. beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr Rev* 2007 Apr; **28(2)**: 187-218.
- 46.Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 2006 Mar; **3(3)**: 153-65.
- 47.Kulkarni RN, Wang ZL, Wang RM, et al. Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. *J Clin Invest* 1997 Dec 1; **100(11)**: 2729-36.
- 48.Nauck M, Stockmann F, Ebert R, et al. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986 Jan; **29(1)**: 46-52.
- 49.Xu G, Stoffers DA, Habener JF, et al. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 1999 Dec; **48(12)**: 2270-6.
- 50.Fineman MS, Bicsak TA, Shen LZ, et al. Effect on glycemic control of exenatide (synthetic exendin-4) additive to existing metformin and/or sulfonylurea treatment in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003 Aug; **26(8)**: 2370-7.
- 51.Ahren B, Landin-Olsson M, Jansson PA, et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 May; **89(5)**: 2078-84.
- 52.Staub A, Sinn L, Behrens OK. Purification and crystallization of glucagon. *J Biol Chem* 1955 Jun; **214(2)**: 619-32.
- 53.Li XC, Liao TD, Zhuo JL. Long-term hyperglucagonaemia induces early metabolic and renal phenotypes of Type 2 diabetes in mice. *Clin Sci (Lond)* 2008 May; **114(9)**: 591-601.
- 54.Li XC, Zhuo JL. Targeting glucagon receptor signalling in treating metabolic syndrome and renal injury in Type 2 diabetes: theory versus promise. *Clin Sci (Lond)* 2007 Aug; **113(4)**: 183-93.
- 55.Klar AJ, Fogel S, Macleod K. MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. *Genetics* 1979 Sep; **93(1)**: 37-50.

- 56.Favero G, Franceschetti L, Rodella LF, et al. Sirtuins, aging, and cardiovascular risks. *Age (Dordr)* 2015 Aug; **37(4)**: 9804.
- 57.Baur JA, Ungvari Z, Minor RK, et al. Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan?. *Nat Rev Drug Discov* 2012 Jun 1; **11(6)**: 443-61.
- 58.Tennen RI, Berber E, Chua KF. Functional dissection of SIRT6: identification of domains that regulate histone deacetylase activity and chromatin localization. *Mech Ageing Dev* 2010 Mar; **131(3)**: 185-192.
- 59.Kelly G. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1. *Altern Med Rev* 2010 Sep; **15(3)**: 245-263.
- 60.He W, Newman JC, Wang MZ, et al. Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012 Sep; **23(9)**: 467-76.
- 61.Tanno M, Sakamoto J, Miura T, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem* 2007 Mar 2; **282(9)**: 6823–32.
- 62.Mei Z, Zhang X, Yi J, et al. Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2016 Dec 5; **35(1)**: 182.
- 63.Ye X, Li M, Hou T, et al. Sirtuins in glucose and lipid metabolism. *Oncotarget* 2017 Jan 3; **8(1)**: 1845-1859.
- 64.Carafa V, Rotili D, Forgione M, et al. Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic. *Clin Epigenetics* 2016 May 25; **8**: 61.
- 65.Kida Y, Goligorsky MS. Sirtuins, Cell Senescence, and Vascular Aging. *Can J Cardiol* 2016 May; **32(5)**: 634-41.
- 66.Sasaki T, Maier B, Koclega KD, et al. Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS One* 2008; **3(12)**: e4020.
- 67.Nasrin N, Kaushik VK, Fortier E, et al. JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS One* 2009 Dec 22; **4(12)**: e8414.
- 68.Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, et al. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* 2002 Nov 22; **277(47)**: 45099-107.
- 69.Shimoyama Y, Suzuki K, Hamajima N, et al. Sirtuin 1 gene polymorphisms are associated with body fat and blood pressure in Japanese. *Transl Res* 2011 Jun; **157(6)**: 339-47.

70. Shimoyama Y, Mitsuda Y, Tsuruta Y, et al. SIRTUIN 1 gene polymorphisms are associated with cholesterol metabolism and coronary artery calcification in Japanese hemodialysis patients. *J Ren Nutr* 2012 Jan; **22(1)**: 114-9.
71. Shan T, Wang Y, Wu T, et al. Porcine sirtuin 1 gene clone, expression pattern, and regulation by resveratrol. *J Anim Sci* 2009 Mar; **87(3)**: 895-904.
72. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004 Jul 16; **305(5682)**: 390-2.
73. Suwa M, Nakano H, Radak Z, et al. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. *Metabolism* 2008 Jul; **57(7)**: 986-98.
74. Mukherjee S, Lekli I, Gurusamy N, et al. Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *Free Radic Biol Med* 2009 Mar 1; **46(5)**: 573-8.
75. Yu W, Fu YC, Zhou XH, et al. Effects of resveratrol on H₂O₂-induced apoptosis and expression of SIRT1 in H9c2 cells. *J Cell Biochem* 2009 Jul 1; **107(4)**: 741-7.
76. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, et al. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009 Apr; **296(4)**: R1071-7.
77. Lee YA, Cho EJ, Yokozawa T. Protective effect of persimmon (*Diospyros kaki*) peel proanthocyanidin against oxidative damage under H₂O₂-induced cellular senescence. *Biol Pharm Bull* 2008 Jun; **31(6)**: 1265-9.
78. Arunachalam G, Yao H, Sundar IK, et al. SIRT1 regulates oxidant- and cigarette smoke-induced eNOS acetylation in endothelial cells: Role of resveratrol. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 Feb 26; **393(1)**: 66-72.
79. Jung-Hynes B, Schmit TL, Reagan-Shaw SR, et al. Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model. *J Pineal Res* 2011 Mar; **50(2)**: 140-9.
80. Imai S, Kiess W. Therapeutic potential of SIRT1 and NAMPT-mediated NAD biosynthesis in type 2 diabetes. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009 Jan 1; **14**: 2983-95.
81. Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Glumm R, et al. Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol* 2008 Apr; **10(4)**: 385-94.

82. Gazzaruso C, Garzaniti A, Buscaglia P, et al. Association between apolipoprotein(a) phenotypes and coronary heart disease at a young age. *J Am Coll Cardiol* 1999 Jan; **33(1)**: 157–63.
83. Cakir I, Perello M, Lansari O, et al. Hypothalamic Sirt1 regulates food intake in a rodent model system. *PLoS One* 2009 Dec 15; **4(12)**: e8322.
84. Picard F, Kurtev M, Chung N, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 2004 Jun 17; **429(6993)**: 771-6.
85. Bordone L, Motta MC, Picard F, et al. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 2006 Feb; **4(2)**: e31.
86. Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, et al. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* 2007 Jul 11; **26(13)**: 3169-79.
87. Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, et al. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* 2007 Oct 15; **21(20)**: 2644-58.
88. Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, et al. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol* 2009 Mar; **29(5)**: 1363-74.
89. Olmos Y, Brosens JJ, Lam EW. Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer. *Drug Resist Updat* 2011 Feb; **14(1)**: 35-44.
90. Wang GL, Fu YC, Xu WC, et al. Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 Mar 13; **380(3)**: 644-9.
91. Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, et al. Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)* 2013 Feb; **124(3)**: 153-64.
92. Orimo M, Minamino T, Miyauchi H, et al. Protective role of SIRT1 in diabetic vascular dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 Jun; **29(6)**: 889-94.
93. Sun C, Zhang F, Ge X, et al. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab* 2007 Oct; **6(4)**: 307-19.
94. Zhang J. The direct involvement of SirT1 in insulin-induced insulin receptor substrate-2 tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 2007 Nov 23; **282(47)**: 34356-64.
95. Wang H, Qiang L, Farmer SR. Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes

containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Mol Cell Biol* 2008 Jan; **28(1)**: 188-200.

96.Morino K, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 2006 Dec; **55 Suppl 2**: S9-S15.

97.Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J* 2007 Apr 4; **26(7)**: 1913-23.

98.Koo SH, Flechner L, Qi L, et al. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 2005 Oct 20; **437(7062)**: 1109-11.

99.Chalkiadaki A, Guarente L. Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nat Rev Endocrinol* 2012 Jan 17; **8(5)**: 287-96.

100.Liu Y, Dentin R, Chen D, et al. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* 2008 Nov 13; **456(7219)**: 269-73.

101.Nie Y, Erion DM, Yuan Z, et al. STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1. *Nat Cell Biol* 2009 Apr; **11(4)**: 492-500.

102.Ponugoti B, Kim DH, Xiao Z, et al. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem* 2010 Oct 29; **285(44)**: 33959-70.

103.Li X, Zhang S, Blander G, et al. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* 2007 Oct 12; **28(1)**: 91-106.

104.Kemper JK, Xiao Z, Ponugoti B, et al. FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab* 2009 Nov; **10(5)**: 392-404.

105.Cariou B, Staels B. FXR: a promising target for the metabolic syndrome?. *Trends Pharmacol Sci* 2007 May; **28(5)**: 236-43.

106.Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Crosstalk between Oxidative Stress and SIRT1: Impact on the Aging Process. *Int J Mol Sci* 2013 Feb 11; **14(2)**: 3834-59.

107.Alcendor RR, Gao S, Zhai P, et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* 2007 May 25; **100(10)**: 1512-21.

108.Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, et al. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int J Mol Sci* 2013 Aug 28; **14(9)**: 17643-63.

- 109.Hwang JW, Yao H, Caito S, et al. Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. *Free Radic Biol Med* 2013 Aug; **61**: 95-110.
- 110.St-Pierre J, Drori S, Uldry M, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 2006 Oct 20; **127**(2): 397-408.
- 111.Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, et al. Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Jul 18; **372**(1): 51-6.
- 112.Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993 Dec 3; **75**(5): 843-54.
- 113.Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000 Feb 24; **403**(6772): 901-6.
- 114.Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci* 2010 Nov; **101**(11): 2309-15.
- 115.Winter J, Jung S, Keller S, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009 Mar; **11**(3): 228-34.
- 116.Yang JS, Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell* 2011 Sep 16; **43**(6): 892-903.
- 117.Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004 Jan 23; **116**(2): 281-97.
- 118.Cinar I, Dursun HG. miRNA Biyogenezi ve Kanser Patogenezindeki Fonksiyonu. *Sakarya Med J* 2016; **6**(2): 64-71.
- 119.Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; **23**: 175-205.
- 120.Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003 Sep 25; **425**(6956): 415-9.
- 121.Lund E, Güttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004 Jan 2; **303**(5654): 95-8.
- 122.Zhang H, Kolb FA, Brondani V, et al. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* 2002 Nov 1; **21**(21): 5875-85.

- 123.Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005 Nov 18; **123(4)**: 631-40.
- 124.Sun W, Julie Li YS, Huang HD, et al. microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu Rev Biomed Eng* 2010 Aug 15; **12**: 1-27.
- 125.Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?. *RNA* 2005 Dec; **11(12)**: 1753-61.
- 126.Yi B, Piazza GA, Su X, et al. MicroRNA and cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013 May; **6(5)**: 401-9.
- 127.Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol* 2011 Nov 8; **8(4)**: 228-36.
- 128.Sekar D, Venugopal B, Sekar P, et al. Role of microRNA 21 in diabetes and associated/related diseases. *Gene* 2016 May 10; **582(1)**: 14-8.
- 129.Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC. Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell* 2011 Feb; **23(2)**: 431-42.
- 130.Dey N, Das F, Mariappan MM, et al. MicroRNA-21 orchestrates high glucose-induced signals to TOR complex 1, resulting in renal cell pathology in diabetes. *J Biol Chem* 2011 Jul 22; **286(29)**: 25586-603.
- 131.Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Dev Biol* 2016 Feb 1; **410(1)**: 1-13.
- 132.Feng J, Xing W, Xie L. Regulatory Roles of MicroRNAs in Diabetes. *Int J Mol Sci* 2016 Oct 17; **17(10)**: E1729.
- 133.White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog Horm Res* 1998; **53**: 119-38.
- 134.Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 Feb; **7(2)**: 85-96.
- 135.Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005 Apr 9-15; **365(9467)**: 1333-46.
- 136.Sale EM, Sale GJ. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci* 2008 Jan; **65(1)**: 113-27.
- 137.Farese RV, Sajan MP, Standaert ML. Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005 Oct; **230(9)**: 593-605.

138. Yang WM, Jeong HJ, Park SY, et al. Induction of miR-29a by saturated fatty acids impairs insulin signaling and glucose uptake through translational repression of IRS-1 in myocytes. *FEBS Lett* 2014 Jun 13; **588(13)**: 2170-6.
139. Agarwal P, Srivastava R, Srivastava AK, et al. miR-135a targets IRS2 and regulates insulin signaling and glucose uptake in the diabetic gastrocnemius skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2013 Aug; **1832(8)**: 1294-303.
140. Liu W, Cao H, Ye C, et al. Hepatic miR-378 targets p110 α and controls glucose and lipid homeostasis by modulating hepatic insulin signalling. *Nat Commun* 2014 Dec 4; **5**: 5684.
141. Sano H, Kane S, Sano E, et al. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 2003 Apr 25; **278(17)**: 14599-602.
142. Bourdeau A, Dubé N, Tremblay ML. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr Opin Cell Biol* 2005 Apr; **17(2)**: 203-9.
143. Harley EA, Levens N. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for the treatment of type 2 diabetes and obesity: recent advances. *Curr Opin Investig Drugs* 2003 Oct; **4(10)**: 1179-89.
144. Vinciguerra M, Foti M. PTEN and SHIP2 phosphoinositide phosphatases as negative regulators of insulin signalling. *Arch Physiol Biochem* 2006 Apr; **112(2)**: 89-104.
145. Sasaoka T, Wada T, Tsuneki H. Lipid phosphatases as a possible therapeutic target in cases of type 2 diabetes and obesity. *Pharmacol Ther* 2006 Dec; **112(3)**: 799-809.
146. Choi K, Kim YB. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med* 2010 Jun; **25(2)**: 119-29.
147. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005 Oct 25; **112(17)**: 2735-52.
148. Ulu MS, Yuksel S. İnsülin Direnci. *Kocatepe Tıp Derg* 2015; **16**: 238-243.
149. Choi SE, Kemper JK. Regulation of SIRT1 by microRNAs. *Mol Cells* 2013 Nov; **36(5)**: 385-92.
150. Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 2009 Jul 30; **460(7255)**: 587-91.

- 151.Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* 2006 Dec 14; **444(7121)**: 868-74.
- 152.Guarente L. Sirtuins, aging, and metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011; **76**: 81-90.
- 153.Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 2010; **5**: 253-95.
- 154.Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012 Mar 7; **13(4)**: 225-238.
- 155.Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, et al. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 2000 Feb 17; **403(6771)**: 795-800.
- 156.Lee J, Kemper JK. Controlling SIRT1 expression by microRNAs in health and metabolic disease. *Aging (Albany NY)* 2010 Aug; **2(8)**: 527-34.
- 157.Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 2006 Nov 1; **20(21)**: 2913-21.
- 158.Banks AS, Kon N, Knight C, et al. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* 2008 Oct; **8(4)**: 333-41.
- 159.Feige JN, Lagouge M, Canto C, et al. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab* 2008 Nov; **8(5)**: 347-58.
- 160.Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, et al. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Jul 15; **105(28)**: 9793-8.
- 161.Xu F, Gao Z, Zhang J, et al. Lack of SIRT1 (Mammalian Sirtuin 1) activity leads to liver steatosis in the SIRT1^{+/-} mice: a role of lipid mobilization and inflammation. *Endocrinology* 2010 Jun; **151(6)**: 2504-14.
- 162.Lee J, Padhye A, Sharma A, et al. A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. *J Biol Chem* 2010 Apr 23; **285(17)**: 12604-11.
- 163.Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Sep 9; **105(36)**: 13421-6.
- 164.Lovis P, Roggli E, Laybutt DR, et al. Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes* 2008 Oct; **57(10)**: 2728-36.

- 165.Ramachandran D, Roy U, Garg S, et al. Sirt1 and mir-9 expression is regulated during glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -islets. *FEBS J* 2011 Apr; **278(7)**: 1167-74.
- 166.Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, et al. Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Mol Cancer Ther* 2011 Aug; **10(8)**: 1470-80.
- 167.Xie H, Lim B, Lodish HF. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes* 2009 May; **58(5)**: 1050-7.
- 168.Strum JC, Johnson JH, Ward J, et al. MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. *Mol Endocrinol* 2009 Nov; **23(11)**: 1876-84.
- 169.Zovoilis A, Agbemenyah HY, Agis-Balboa RC, et al. microRNA-34c is a novel target to treat dementias. *EMBO J* 2011 Sep 23; **30(20)**: 4299-308.
- 170.Ito T, Yagi S, Yamakuchi M. MicroRNA-34a regulation of endothelial senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 Aug 6; **398(4)**: 735-40.
- 171.Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, et al. MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1. *Circulation* 2009 Oct 13; **120(15)**: 1524-32.
- 172.Akao Y, Noguchi S, Iio A, et al. Dysregulation of microRNA-34a expression causes drug-resistance to 5-FU in human colon cancer DLD-1 cells. *Cancer Lett* 2011 Jan 28; **300(2)**: 197–204.
- 173.Kojima K, Fujita Y, Nozawa Y, et al. MiR-34a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory prostate cancer PC3 cells through direct and indirect mechanisms. *Prostate* 2010 Oct 1; **70(14)**: 1501–12.
- 174.Luan S, Sun L, Huang F. MicroRNA-34a: a novel tumor suppressor in p53-mutant glioma cell line U251. *Arch Med Res* 2010 Feb; **41(2)**: 67–74.
- 175.Pogribny IP, Muskhelishvili L, Tryndyak VP, et al. The tumor-promoting activity of 2-acetylaminofluorene is associated with disruption of the p53 signaling pathway and the balance between apoptosis and cell proliferation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009 Mar 15; **235(3)**: 305–11.
- 176.Fujita Y, Kojima K, Hamada N, et al. Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Dec 5; **377(1)**: 114–9.

- 177.Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, et al. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS One* 2010 Feb 2; **5(2)**: e9022.
- 178.Khanna A, Muthusamy S, Liang R, et al. Gain of survival signaling by down-regulation of three key miRNAs in brain of calorie-restricted mice. *Aging (Albany NY)* 2011 Mar; **3(3)**: 223-36.
- 179.Aranha MM, Santos DM, Solá S, et al. miR-34a regulates mouse neural stem cell differentiation. *PLoS One* 2011; **6(8)**: e21396.
- 180.Lizé M, Pilarski S, Dobbelstein M. E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 2010 Mar; **17(3)**: 452–8.
- 181.Bou Kheir T, Futoma-Kazmierczak E, Jacobsen A, et al. miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer. *Mol Cancer* 2011 Mar 18; **10**: 29.
- 182.Xu D, Takeshita F, Hino Y, et al. miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J Cell Biol* 2011 Apr 18; **193(2)**: 409–24.
- 183.Eades G, Yao Y, Yang M, et al. miR-200a regulates SIRT1 expression and epithelial to mesenchymal transition (EMT)-like transformation in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 2011 Jul 22; **286(29)**: 25992–6002.
- 184.Zhu H, Yang Y, Wang Y, et al. MicroRNA-195 promotes palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes by down-regulating Sirt1. *Cardiovasc Res* 2011 Oct 1; **92(1)**: 75–84.
- 185.Rane S, He M, Sayed D, et al. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res* 2009 Apr 10; **104(7)**: 879–86.
- 186.Li L, Gao P, Zhang H, et al. SIRT1 inhibits angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011 Feb; **43(2)**: 103–9.
- 187.Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 2007 Jul 26; **26(34)**: 5017–22.
- 188.Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, et al. Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Mol Cancer Ther* 2011 Aug; **10(8)**: 1470–80.

- 189.Zhao T, Li J, Chen AF. MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010 Jul; **299(1)**: E110–6.
- 190.Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}. *J Biol Chem* 2005 Apr 22; **280(16)**: 16456–60.
- 191.Purushotham A, Schug TT, Xu Q, et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab* 2009 Apr; **9(4)**: 327–38.
- 192.Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 2011 Jun 8; **474(7353)**: 649-53.
- 193.Cheung O, Puri P, Eicken C, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* 2008 Dec; **48(6)**: 1810-20.
- 194.Li N, Muthusamy S, Liang R, et al. Increased expression of miR-34a and miR-93 in rat liver during aging, and their impact on the expression of Mgst1 and Sirt1. *Mech Ageing Dev* 2011 Mar; **132(3)**: 75-85.
- 195.Choi SE, Fu T, Seok S, et al. Elevated microRNA-34a in obesity reduces NAD⁺ levels and SIRT1 activity by directly targeting NAMPT. *Aging Cell* 2013 Dec; **12(6)**: 1062-72.
- 196.Fu T, Choi SE, Kim DH, et al. Aberrantly elevated microRNA-34a in obesity attenuates hepatic responses to FGF19 by targeting a membrane coreceptor β -Klotho. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 Oct 2; **109(40)**: 16137-42.
- 197.Liu N, Landreh M, Cao K, et al. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in Drosophila. *Nature* 2012 Feb 15; **482(7386)**: 519-23.
- 198.Yang ZM, Chen LH, Hong M, et al. Serum microRNA profiling and bioinformatics analysis of patients with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Mol Med Rep* 2017 Apr; **15(4)**: 2143-2153.
- 199.Pescador N, Perez-Barba M, Ibarra JM, et al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS One* 2013 Oct 15; **8(10)**: e77251.
- 200.Yang Z, Chen H, Si H, et al. Serum miR-23a, a potential biomarker for diagnosis of pre-diabetes and type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 2014 Oct; **51(5)**: 823-31.

- 201.Kong L, Zhu J, Han W, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol* 2011 Mar; **48(1)**: 61-9.
- 202.Liu H, Jin M, Tian H, et al. MiR-34a and miR-34c are involved in the pathogenesis of type-2 diabetes by modulating the cell cycle of pancreatic beta-cell. *Int J Clin Exp Pathol* 2016; **9(5)**: 5340-5.
- 203.Zhao C, Dong J, Jiang T, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PLoS One* 2011; **6(8)**: e23925.
- 204.Shao Y, Ren H, Lv C, et al. Changes of serum Mir-217 and the correlation with the severity in type 2 diabetes patients with different stages of diabetic kidney disease. *Endocrine* 2017 Jan; **55(1)**: 130-138.
- 205.Fathy SA, Ibrahim DM, Elkhayat WA, et al. Association between serum sirt 1 and advanced glycation end products levels in type 2 diabetic nephropathy patients. *Int J Biosci* 2017; **10(5)**: 398-404.
- 206.Shao Y, Ren H, Wang Q. The relationship between serum Sirt1 and EGR1 and other inflammatory cytokines in type 2 diabetic patients with different stages of diabetic nephropathy. *Journal of Chinese Physician* 2016; **18(8)**: 1181-1184, 1189.

ETİK KURUL KARARI

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı : 1242

Konu : Doç. Dr. Neslihan ABACI hk.

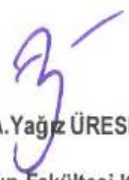
Tarih : 31.10.2016

**Sayın Doç. Dr. Neslihan ABACI
Genetik**

İlgi: Genetik Anabilim Dalının 14/10/2016 gün ve 370701 sayılı yazı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Özlem GÖK' ün yürüteceği 2016/1232 dosya numaralı "Sirt1 ve Tip 2 Diyabet Arasındaki İlişkinin İncelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 28/10/2016 tarih ve 18 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağz ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Sırt1 ve Tip 2 Diyabet Arasındaki İlişkinin İncelenmesi"			
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Neslihan ABACI			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Genetik			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı			
DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
	Yüksek Doz Araştırması	☐		
	Diğer ise belirtiniz :			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Sırt1 ve Tıp 2 Diyabet Arasındaki İlişkinin İncelenmesi"
-----------------------	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	24/10/2016		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☒	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:18	Tarih: 28/10/2016		
	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalında görevli Doç. Dr. Neslihan ABACI' nın sorumluluğunda ve Özlem GÖK' ün yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU								
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *	Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		

* :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığının izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığının iznine tabi değildir.

SIRT1 VE TİP 2 DİYABET ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ

Yazar Özlem Gök

Gönderim Tarihi: 06-Kas-2017 11:53AM (UTC+0200)

Gönderim Numarası: 875152233

Dosya adı: SIRT1_VE_T_P_2_D_YABET_ARASINDAK_L_K_N_N_NCELENMES.doc (879.5K)

Kelime sayısı: 20522

Karakter sayısı: 136863

SIRT1 VE TİP 2 DİYABET ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ

ORJINALLIK RAPORU

% 14	% 10	% 9	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Sakarya University Öğrenci Ödevi	% 2
2	readgur.com İnternet Kaynağı	% 2
3	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	www.tkd-online.org İnternet Kaynağı	% 1
5	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
6	YÖNTEM GÖK, Nesrin, GÖNENÇ ORTAKÖYLÜ, Mediha, BAHADIR, Ayşe, ALKAN, Figen and ÇAĞLAR, Emel. "Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığında Vasküler Endotelyal Growth Faktör ile İnflamasyon Belirteçlerinin Kan Düzeylerinin Karşılaştırılması ve Fonksiyonel Parametrelerle Arasındaki İlişki", Türkiye Solunum	<% 1