

KORONER ARTER HASTALARINDA NUCB2/NESFATİN-1 GEN VARYASYONLARININ DİSLİPİDEMİK FENOTİPLE İLİŞKİLERİNİN İNCELENMESİ

STUDY ON RELATIONSHIP BETWEEN THE GENE VARIATION OF THE NUCB2/NESFATIN-1 AND DYSLIPIDEMIC PHENOTYPE IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE

Fatih Yanar¹, Ender Coşkunpınar³, Bengü Tokat¹, Zehra Buğra², Oğuz Öztürk¹, Hülya Yılmaz-Aydoğan¹,

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı

²İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kardiyoloji Bilim Dalı

³İstanbul Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

ÖZET

Amaç. Koroner arter hastalığı (KAH) etyopatogenezinde yer alan ateroskleroz, atar damarların esnekliğini yitirip kalınlaşması sonucu gelişen bir süreçtir. Aterosklerozda risk faktörlerinden olan diyabetin oluşum nedenlerinden biri obezitedir. Obezite gelişiminde; iştah oluşumu ve enerji düzenlenmesinde rol oynadığı bilinen melanokortin yolağının etkili olduğu bilinmektedir. Son çalışmalarda bu yolla etkili olduğu tanımlanan Nesfatin-1'in metabolizma ve enerji homeostazisi ile ilgili periferik dokularda eksprese edildiği, diyetle oluşturulan obezite modelinde ekspresyonunun arttığı ve gıda mahrumiyetinde protein seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir.

Obezite üzerinde etkisi nedeniyle NUCB2/Nesfatin-1, diyabet ve dolayısıyla ateroskleroz gelişiminde aday genlerden biridir. Bu amaçla projemizde NUCB2 gen varyasyonlarının koroner arter hastalığı gelişim riski, serum lipid/lipoprotein seviyeleri ve aterosklerotik risk faktörleri

ile olası ilişkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem. Çalışmamızda NUCB2/Nesfatin-1 gen polimorfizmlerinden rs1330 ve rs757081 SNP'leri çalışılmıştır. Çalışma gruplarımız 65 KAH ve 39 gönüllü sağlıklı kontrolden oluşturulmuştur. NUCB2/Nesfatin-1 genotipleri gerçek-zamanlı PZR teknikleri kullanılarak belirlenmiştir.

Bulgular. NUCB2/Nesfatin-1 rs757081 ve rs1330 genotip ve allel dağılımları hasta ve kontrol gruplarında benzerdir ($p>0.05$). KAH grubunda rs1330 CC'lerde heterozigot CT'lara göre serum LDL-K ($p=0,043$) ve SKB değerleri ($p=0,035$) yüksek gözlenmiştir. Ayrıca KAH grubunda rs1330 C allel taşıyanlarda Total-kolesterol $\geq 5,18$ olma riski yüksek tespit edilmiştir ($p=0,020$).

Sonuç. Bulgularımız NUCB2/Nesfatin-1 gen varyasyonlarının KAH grubunda metabolik risk faktörleri ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir.

SUMMARY

Objective. Atherosclerosis which has a role in etiopathology of coronary artery disease (CAD) is a process that occurs in time when the arteries lost their flexibility. It was known that the regulation of energy and the melanocortin pathway which has a special role in appetite is effective in development of obesity. Studies in recent years show that in rats the central injection of nesfatin-1 which is a new identified gene in this pathway reduces food intake. It was showed that the nesfatin-1 has an appetite suppressant effect and it has a role in central pathways that control food intake.

Because of NUCB2/Nesfatin-1 has an effect on obesity it is a candidate gene which is responsible for causing CAD. In our thesis project we intend to identify the relationship between NUCB2 gene variations and the atherosclerotic risk factors like obesity, type2 diabetes mellitus, gender and the progress risk of CAD that is occurring as a result of atherosclerosis.

Material and Methods. Our study groups consisted of 65 CAD patients and 39 healthy controls and rs1330, and rs757081 variations are investigated. Genotypes were determined by realtime PCR.

Results. Genotype and allele frequencies of rs757081 ve rs1330 are similar in CAD and in control group ($p>0.05$). In CAD group of rs1330 normal CC genotype has higher leves of LDL-C ($p= 0,043$) and SBP($p=0,035$) in comparison with CT genotype. And also in CAD group total the risk of having cholesterol $\geq 5,18$ is observed high levels in rs1330 C allele.

Conclusion. Our findings indicate that the NUCB2/Nesfatin-1 gene variations may be associated with metabolic risk factors in coronary artery disease.

GİRİŞ

Obezite gelişiminin genetik faktörlerle olan ilişkisi büyük ölçüde kanıtlanmıştır (1,2). Fakat bu oluşumda rol alan genlerin araştırılması son derece yavaş ilerlemektedir. Bunun en muhtemel nedeni obezite oluşumunun birçok faktörü içermesidir. Leptin hormonu ile düzenlenen melanokortin yolağının, iştah oluşumunda ve enerji düzenlenmesinde önemli rol oynadığı dolayısı ile obezite oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir (3). Buradan bu yolakla ilgili bütün genlerin dizi varyasyonlarının obezite gelişimine etki edebileceği sonucunu çıkartabiliriz (4,5).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu yolakta nesfatin-1 adlı bir gen tanımlanmıştır. Nesfatin-1, öncül protein nucleobindin-2 (/NUCB2) tarafından işlenen ve NUCB2 geninin kodladığı, hipotalamusta yeni bir doyumluk molekülü olarak tanımlanan bir nöropeptitdir (4,5). İnsanlarda bu protein yaklaşık 10 sene önce tanımlanmış (3) ve NEFA (DNA binding/EF-hand/acidic protein) ya da nucleobindin'e yüksek derecede benzer olduğu için nucleobindin-2 adını almıştır. Nesfatin, 396 amino asit içeren bir protein olup, 24 aminoasitlik öncü sinyal taşır.

NUCB2 geni nesfatin-1, nesfatin-2 ve nesfatin-3 olmak üzere 3 tip nesfatin proteini kodlamaktadır. Nesfatin-1 'in sıçanlarda merkezi enjeksiyonunun gıda alımını, dolayısıyla da vücut ağırlığını azalttığı gösterilmiştir (6). Buna karşın nesfatin-2 ya da nesfatin-3 'ün herhangi bir anoreksik etkisi olmamıştır. Üç işlevsel bölgeye sahip olduğu gösterilen Nesfatin-1 proteininde yapılan fonksiyonel analizler orta bölgenin anoreksik etki içeren bölge olduğunu ortaya koymuştur (6). Yapı analizleri sıçan nesfatininde, prohormon konvertaz (PCSK1) için tanıma bölgeleri olduğunu ortaya koymuştur (3). PCSK1, leptin melanokortin yolağında rol alan ve obezite ile ilişkili bir genidir (7).

Nesfatin-1'in immünonörolizasyon çalışmaları da iştahın arttığını göstermiştir. Benzer şekilde NUBC2/nesfatin-1'in antisense morfolino oligonucleotide (as-MON) ile bozulması sonucunda iştah ve vücut ağırlığı yine artmıştır. Bütün bunlar, nesfatin-1'in iştah bastırıcı bir etkisi olduğunu göstermektedir (3).

Nöroanatomik çalışmalar da NUBC2/nesfatin-1'in, gıda alımını kontrol eden merkezi yolaklarda rol aldığını göstermektedir. İmmunohistokimyasal çalışmalar; arkuat nukleus (ARC), paraventrikular nukleus (PVN), supra optik nukleus (SON) ve lateral hipotalamik alan (LHA) gibi çeşitli hipotalamik çekirdekler ile tractus soliterius gibi çok önemli beslenme bölgelerinde NUCB2/nesfatin-1 varlığını kanıtlamıştır (6).

NUCB2/Nesfatin-1 gen bölgesi varyasyonları koroner kalp hastalarında günümüze kadar araştırılmamıştır. Nesfatin-1 seviyelerinin iştah üzerine etkisi ve sonucunda obeziteye etkisi sebebiyle bu proteine ait genlerde meydana gelecek varyasyonların ateroskleroz gelişiminde etkili olabileceği hipotezinden yola çıkarak tez projemizde bu amaçla hedef çalışma grubu olarak seçtiğimiz koroner kalp hastalarında NUCB2 genindeki rs757081 ve rs1330 varyasyonlarının dağılımlarını ve hastalığın gelişiminde risk faktörü olarak bireysel ve kombine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Seçilen Örneklerin Tanımı

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kardiyoloji Kliniği'nde takip edilen 65 Koroner arter hastası (KAH) ve 39 sağlıklı kontrolden oluşturulan iki grupta NUCB2 genindeki rs757081 ve rs1330 SNP'leri incelenmiştir. Birinci grup için, hipertansiyon ve kalp rahatsızlığı hikayesi olmayan sağlıklı bireyler seçilerek kontrol

grubu oluşturuldu. İkinci grup, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı tarafından takip edilen koroner arter hastalığı tanısı konmuş hastalardan oluşturuldu.

Bu çalışma, Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak düzenlenmiş olup çalışmaya dahil edilen gönüllülerden yazılı onay alınmıştır. Çalışmanın etik onayı, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

DNA İzolasyonu ve Genotipleme

Steril EDTA'lı tüplere alınmış olan periferik kan örneklerinden DNA izolasyon kiti kullanılarak genomik DNA izole edildi (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Almanya).

NUCB2 geni rs757081 ve rs1330 SNP'leri gerçek-zamanlı PZR yöntemi kullanılarak incelendi.

Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu için 10,4 µl dH₂O, 1,6 µl MgCl₂ (25mM), 2,0 µl LightCycler® FastStart HybProbe Reaction Mix ve LightCycler® FastStart Enzyme karışımı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya), 1,0 µl floresan etiketli LightSNiP primer-prob seti (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Almanya) kullanılarak hazırlanan karışımına 100ng/µl içeren 5µl DNA'lar eklenerek 20 µl'lik son hacime ulaşıldı. Amplifikasyon işlemi LightCycler® 480 cihazında (Roche Diagnostics) gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PZR koşulları 95°C'de 10 dakikalık ön denatürasyonun ardından 45 döngüden oluşan döngü aşamasında 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 10 saniye ve 72°C'de 15 saniye olacak şekilde, erime aşamasında 95°C'de 30 saniye, 40°C'de 2 dakika ve soğuma aşamasında 40°C'de 30 saniye olarak düzenlendi.

İstatistiksel Analiz

Tez çalışmamızın istatistiksel analizleri SSPS 20,0 paket programı kullanılmıştır. Niceliksel verilerin (Ortalama, Standart sapma) (serum lipid düzeyleri, kan basınçları ve vücut kitle indeksi gibi) gruplararası karşılaştırılması Student's t testi, ikiden fazla değişkenin olduğu genotip karşılaştırmalarında ANOVA testi kullanılmıştır. NUCB2 geni rs757081 ve rs1330 SNP genotip ve allel karşılaştırmaları, klinik ve klinik olmayan parametrelerin allellerle karşılaştırılmasında ve Hardy-Weinberg dengesine uyum gibi niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki kare (χ^2) testi kullanılmıştır. Allel frekansı hesaplamaları gen sayma yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar %95 güven aralığında, istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

KAH hasta ve kontrol gruplarının demografik ve metabolik özellikleri Tablo 1 'de verilmiştir. Yapılan istatistik analizde hasta ve kontrol grupları arasında yaş ortalaması, cinsiyet dağılımı, vücut kitle indeksleri (VKİ), serum lipid düzeyleri, alkol kullanım oranı ve koroner arter hastalığı aile hikayesi açısından anlamlı bir farklılık gözlenmezken ($p > 0.05$), sistolik ve diastolik kan basınçları ($p < 0.05$) ve sigara kullanım oranı açısından farklılık bulunmuştur ($p < 0.01$). KAH hasta grubunda kan basıncı düzeyleri ve sigara kullanımını kontrol grubuna göre yüksektir. KAH hasta grubunu oluşturan bireylerin % 38.8'inin tip 2 diyabetik, %41.2'sinin hipertansif olduğu ve hastaların % 37.3'ünde sol ventrikül hipertrofisi bulunduğu tespit edilmiştir. Hastaların tümü lipid düşürücü statin tedavisi almaktaydı.

Kontrol ve koroner arter hasta gruplarında NUCB2 geni rs757081 ve rs1330 SNP'lere ait genotip, allel dağılımları ve Hardy-Weinberg Eşitliği (HWE)'ne uyumları Tablo 2'de

gösterilmiştir. NUCB2 geni rs757081 ve rs1330 genotip dağılımları kontrol ve KAH hasta gruplarında HWE'ye uyumlu bulunmuştur ($p > 0,05$). Kontrol grubunda NUCB2/Nesfatin-1 rs757081 varyasyonunun normal C allel frekansı %67,57, nadir G allel frekansı %32,43 iken KAH hasta grubunda sırasıyla %74,19 ve %25,81 bulunmuştur. NUCB2/Nesfatin-1 rs757081 varyasyonunun çalışma gruplarındaki dağılımı istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Kontrol grubunda NUCB2/Nesfatin-1 rs1330 varyasyonunun normal C allel frekansı %67,95, nadir T allel frekansı %32,05 iken KAH hasta grubunda sırasıyla %70,77 ve %29,23 bulunmuştur. NUCB2/Nesfatin-1 rs1330 varyasyonunun da çalışma gruplarındaki dağılımı benzer bulunmuştur ($p > 0.05$).

NUCB2/Nesfatin-1 rs757081 genotiplerinin çalışma gruplarında serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi incelendiğinde; hem kontrol grubunda hem de KAH hasta grubunda herhangi bir etki gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Tablo 3). NUCB2/Nesfatin-1 rs1330 genotiplerinin çalışma gruplarında serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi incelendiğinde; kontrol grubunda herhangi bir etki gözlenmezken ($p > 0,05$); KAH hasta grubunda homozigot CC'lerde heterozigot CT'lere göre serum LDL-kolesterol düzeyi ($p = 0,043$) ve sistolik kan basıncı değeri ($p = 0,035$) yüksek gözlenmiştir. Ayrıca rs1330 TT genotipli hastalarla CT genotipi taşıyan hastalar karşılaştırıldığında diastolik kan basıncı düzeyi yüksek gözlenmiştir ($p = 0,055$) (Tablo 4).

Tablo 5'te çalışma gruplarında eşik metabolik risk değerleri (Total-kolesterol $\geq 5,18$, Triglicerid $\geq 1,70$, HDL-K $\leq 0,90$, LDL-K $\geq 3,36$ ve Vücut kitle indeksi $\geq 27,5$) üzerinde NUCB2/Nesfatin-1 genotiplerinin etkileri gösterilmiştir. Yapılan istatistik analizde KAH hasta grubunda NUCB2/Nesfatin-1 genotipleri

ile eşik metabolik risk değerleri arasında herhangi bir ilişki gözlenmemiştir. Kontrol grubunda ise sadece NUCB2/Nesfatin-1 rs1330 normal C allel taşıyan bireylerde nadir homozigot TT genotipi taşıyanlara kıyasla Total-kolesterol \geq 5,18 olma riski yüksek bulunmuştur (Fisher's exact test, p=0,020).

Tablo 6 'de KAH hasta grubunda cinsiyete göre lipid, kan basıncı ve VKİ değerleri verilmiştir. Buna göre kadın ve erkek alt grupları arasında incelenen parametreler açısından istatistiksel anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0.05). Tablo 7'de KAH Hasta Grubunda Cinsiyete Göre NUCB2/Nesfatin-1 Genotiplerinin Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkileri gösterilmiştir. Yapılan istatistik analizde erkek hasta alt grubunda sadece NUCB2 rs1330 'un sistolik kan basıncı değerlerine istatistiksel olarak anlamlı etkisi gözlenmiştir. Homozigot CC'lerde T alleli taşıyan gruba kıyasla sistolik kan basıncı değerlerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (CC:140,68 \pm 32,30 , T alleli : 121,60 \pm 21,92 . p:0,021). Kadın hasta alt grubunda ise NUCB2 genotiplerinin incelenen parametreler üzerinde etkisi gözlenmemiştir.

TARTIŞMA

İnsülin salgılanması ya da etkisindeki düzensizlikler sonucu metabolizmada meydana gelen bozulmalara yol açan diyabetin ve diyabetin risk faktörlerinden biri olup vücutta anormal şekilde yağ birikmesi ile karakterize obezitenin aterosklerozun risk faktörü olması (8,9), bu hastalıkların olası risk faktörlerinden kaçınmanın da kardiyovasküler rahatsızlıklara karşı korunmada önemli bir rol oynayacağını göstermektedir.

Leptin hormonu ile düzenlenen melanokortin yolağının, iştah oluşumunda ve enerji düzenlenmesinde önemli rol

oynadığı bilinmektedir. Buradan, genetik faktörlerle ilişkisi kanıtlanmış olan obezite oluşumunun bu yolakla ilgili genlerin dizi varyasyonları ile ilişkili olabileceği ortadadır (1-5).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu yolakta tanımlanan NUCB2/nesfatin-1'in merkezi enjeksiyonunun gıda alımını azalttığı gösterilmiştir (6). Nesfatin-1'in bir doygunluk molekülü olduğu ve iştah bastırıcı etkisi olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (3). Obez hastalarda yapılan son çalışmalarda diyetle nesfatin-1 plazma seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (10).

Zhao ve ark.nın hipertansif obez hastalarla yaptıkları çalışmada ise açlık durumunda nesfatin-1 seviyeleri hasta grubunda kontrol grubuna oranla daha yüksek bulunmuştur. Bunlara ek olarak vücut kütle indeksi, sistolik kan basıncı ve diyastolik kan basıncı düzeyleri açlık durumunda nesfatin-1 plazma seviyeleri ile pozitif şekilde ilişkili bulunmuştur. Çalışma sonucunda ayrıca nesfatin-1'in obezite durumunda gelişen hipertansiyonda etkili olabileceği ve nesfatin-1 düzeyindeki artışın hipertansiyon için bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (11).

Obez hastalarla Mirzaei ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan bir diğer çalışmada, yağ yüzdesi ile dolaşımda bulunan nesfatin-1 seviyesi arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Çalışma bulguları vücut yağ yüzdesinin dolaşımdaki nesfatin-1 seviyesi için bir belirleyici olabileceği ve nesfatin-1'in adipogenezde rol oynayabileceği bildirilmiştir (12).

Dai ve ark 2013 yılında Çin toplumunda 48 akut myokard infarktüsü, 74 stabil angino pektorisli ve 34 kontrolden oluşan grupta yaptıkları çalışma sonucunda akut myokard infarktüsü geçiren hasta grubunda hem stabil angino pektorisli ve hemde kontrol grubuna kıyasla plazma

nesfatin-1 seviyelerinin düşük olduğunu bildirmişlerdir (13).

Catak ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; fruktoz ile uyarılmış metabolik sendromlu farelerde sağlıklı kontrol grubuna göre açlık insülin, glikoz, trigliserid, LDL- kolesterol seviyeleri oldukça yüksek, HDL-kolesterol düzeyi ise oldukça düşük bulunmuştur. Metabolik sendromlu farelerde serum ve doku süpernatant nesfatin-1 seviyeleri de kontrol grubuna oranla oldukça yüksek bulunmuştur (14). Bu çalışmaya ait Nesfatin-1'in serum lipid/lipoprotein düzeyleri üzerindeki etkileri sebebiyle nesfatin-1'in ateroskleroz ve koroner kalp hastalığı gelişiminde de etkili olacağı çıkarımını yapabiliriz.

Bizim çalışmamızda Nesfatin-1 seviyelerinin iştah ve sonucunda obeziteye etkisi sebebiyle bu proteine ait genlerde meydana gelecek varyasyonların ateroskleroz gelişiminde etkili olabileceği hipotezinden yola çıkarak hedef çalışma grubu olarak seçtiğimiz koroner arter hastalarında NUCB2 genindeki rs757081 ve rs1330 varyasyonlarının dağılımları ve hastalığın gelişiminde risk faktörü olarak bireysel ve kombine etkileri araştırılmıştır. Araştırdığımız NUCB2/Nesfatin-1 gen bölgesi varyasyonları koroner arter hastalarında günümüze kadar çalışılmamış olup, bu anlamda uluslararası tıp literatüründeki ilk çalışmadır.

Doreen Zegers ve ark. tarafından NUCB2 geninde yer alan 8 varyasyon ile obezite arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla beyaz Belçika toplumundan seçtikleri 1049 obez (491 erkek, 558 kadın), 315 sağlıklı kontrolde (100 erkek, 215 kadın) yapılan çalışmada erkekler ile kadınlar birarada incelendiğinde NUCB2 varyasyonlarının hiçbirisi ile obezite arasında ilişki olmadığı bildirilmiştir. Ancak sadece erkek hasta alt grubunda incelendiğinde NUCB2 rs214101, rs757081 ve rs1330 varyasyonları ile obezite, vücut kütle

indeksi, kilo ve yağsız vücut kütlesi açısından anlamlı ilişki olduğu bildirilmiştir. Bu verilere dayanarak NUCB2 gen varyasyonlarının erkeklerde obezite gelişiminde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (15).

Doreen Zegers ve ark.nın çalışmasında (15) Belçika toplumuna ait NUCB2 geninde araştırdıkları SNP'lere ait minör allel frekansları bildirilmiştir. Doreen Zegers ve ark.nın minör allel olarak tanımladıkları rs1330 A alleli bizim çalışmamızda da minör allel olarak ortaya çıkmış fakat rs757081 C alleli ata allel olarak ortaya çıkmıştır. Öte yandan bizim araştırmamızda obezite ile NUCB2 rs757081 ve rs1330 varyasyonları arasında ilişki gözlenmemiştir. Doreen Zegers ve ark.da kadın ve erkek tüm grubu bir arada inceledikleri bu varyantlar ile obezite ilişkisini görmemişler ancak erkek hasta alt grubunda ilişki bulmuşlardır.

Biz çalışmamızda koroner arter hasta grubunda kadın erkek cinsiyete göre alt gruplar oluşturarak istatistik analiz yaptığımızda erkek hastalarda NUCB2 rs1330 CC genotipinin yüksek sistolik kan basıncı düzeyleri ((p=0,021) ile ilişkili olduğunu tespit ettik. KAH hasta grubunda kadın ve erkekler arasında serum lipid/lipoprotein, kan basıncı ve vücut kitle indeksi değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05). Bulgularımız NUCB2 gen varyasyonlarını cinsiyete göre farklı etki göstermesi açısından Doreen Zegers ve ark.nın çalışması ile uyumludur. Ancak biz çalışmamızda örnek sayısının azlığı nedeniyle kontrol grubunda kadın/erkek alt grup araştırması yapamadık. Bundan başka bizim ve Doreen Zegers ve ark.nın çalışmaları arasında NUCB2 allel dağılımlarında rs757081 açısından gözlenen farklılığın etnik/coğrafik farklılıktan veya örnek sayıları arasındaki farklılıktan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda koroner arter hastalığı riski açısından incelediğimizde, NUCB2/Nesfatin-1 rs757081 ve rs1330 varyasyonlarının dağılımları ise çalışma gruplarımız arasında benzer bulunmuştur, diğer bir deyişle bu varyasyonlarla KAH riski arasında ilişki gözlenmemiştir ($p>0,05$). NUCB2/Nesfatin-1 rs757081 varyasyonunun hem KKH riski hem de incelenen diğer risk parametreleriyle ilişkisi gözlenmezken ($p>0,05$), NUCB2/Nesfatin-1 rs1330 varyasyonu homozigot CC genotipi KAH hastalarında yüksek serum LDL-kolesterol ve sistolik kan basıncı değerleri (sırasıyla $p=0,043$ ve $p=0,035$) ile ilişkili bulunmuştur. Sağlıklı kişilerde ise bu varyasyonun etkisi gözlenmemiştir.

Sonuç olarak, NUCB2 gen varyasyonları ile serum HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol düzeylerinin ilişkisine işaret eden bulgularımız Catak ve ark.nın (13) Nesfatin-1'le protein seviyesinde yaptıkları ve bu proteinin serum lipid/lipoprotein seviyeleriyle ilişkili olduğunu önerdikleri çalışma bulgularını desteklemektedir.

Çalışmamızda NUCB2/Nesfatin-1 rs1330 CC genotipinin KAH hastalarında yüksek-LDL-kolesterol düzeyleri ile ilişkisine dayanarak NUCB2 geninin koroner kalp hastalığı için aday genler arasında yer alabileceğini önermekteyiz. Bulgularımızın örnek sayısının artışı ile daha ileri anlamlılık kazanacağı ve NUCB2 geni ile KAH ilişkisinin güçleneceği kanaatindeyiz.

Teşekkür. Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36338

Kaynaklar

1. Stunkard AJ, Foch TT, Hrubec Z. A twin study of human obesity, JAMA 1986; 256:51-54.

2. Beckers S, Zegers D, Van Gaal LF, Van Hul W. The role of the leptin-melanocortin signalling pathway in the control of food intake. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2009; 19:267-287.

3. Oh IS, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. Nature 2006; 443:709-712.

4. Barnikol-Watanabe S, Gross NA, Gotz H, Henkel T, Karabinos A, Kratzin H, Barnikol HU, Hilschmann N. Human protein NEFA, a novel DNA binding/EF-hand/leucinezipper protein. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA, isolation and characterization of the protei., Biol Chem Hoppe Seyler 1994; 375: 497-512.

5. Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. The novel function of nesfatin-1: anti-hyperglycemia. Biochem Biophys Res Commun 2010; 391: 1039-1042.

6. Shimizu H, Oh IS, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin independent mechanism. Endocrinology 2009; 150: 662-671.

7. Benzinou M, Creemers JW, Choquet H, Lobbens S, Dina C, Durand E, Guerardel A, Boutin P, Jouret B, Heude B, Balkau B, Tichet J, Marre M, Potoczna N, Horber F, Le Stunff C, Czernichow S, Sandbaek A, Lauritzen T, Borch-Johnsen K, Andersen G, W. Kiess, Korner A, Kovacs P, Jacobson P, Carlsson LM, Walley AJ, Jorgensen T, Hansen T, Pedersen O, Meyre D, Froguel P. Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. Nat Genet 2008;40:943-945.

8. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı Eylem Planı (2011-2014) Ankara,2011.

gene, NUCB2, and obesity in men. *Mol Genet Metab* 2011;103: 282–286

9. Topsakal Ş, Akın F. Definition, Epidemiology and Clinical Evaluation of Obesity. *Turkiye Klinikleri J Endocrin Special Topics* 2013;6(1):1-6.

10. Guo Y, Xing M, Sun W, Yuan X, Dai H, Ding H. Plasma nesfatin-1 level in obese patients after acupuncture: a randomised controlled trial. *Acupunct Med* 2014;32:313-317.

11. Zhao Y, Ma X, Wang Q, Zhou Y, Zhang Y, Wu L, Ji H, Qin G, Lu J, Bi Y, Ning G. Nesfatin-1 correlates with hypertension in overweight or obese Han Chinese population. *Clin Exp Hypertens*. 2015;37(1):51-56.

12. Mirzaei K, Hossein-Nezhad A, Keshavarz SA, Koohdani F, Eshraghian MR, Saboor-Yaraghi AA, Hosseini S, Chamari M, Zareei M, Djalali M. Association of nesfatin-1 level with body composition, dietary intake and resting metabolic rate in obese and morbid obese subjects. *Diabetes Metab Syndr*. 2015;9(4):292-298.

13. Dai H, Li X, He T, Wang Y, Wang Z, Wang S, Xing M, Sun W, Ding H. Decreased plasma nesfatin-1 levels in patients with acute myocardial infarction. *Peptides* 2013; 46: 167-171.

14. Catak Z, Aydin S, Sahin I, Kuloglu T, Aksoy A, Dagli AF. Regulatory neuropeptides (ghrelin, obestatin and nesfatin-1) levels in serum and reproductive tissues of female and male rats with fructose-induced metabolic syndrome. *Neuropeptides* 2014;48(3):167-177.

15. Zegers D, Beckers S, Mertens IL, Van Gaal LF, Van Hul W. Association between polymorphisms of the Nesfatin

1.Çalışma Gruplarının Karakteristik Özellikleri

	Gruplar		p değeri
	Kontrol (n=39)	KAH Hasta (n=65)	
Yaş (yıl)	56,17±9,338	58,29±12,254	0,342
Cinsiyet (Kadın/Erkek) (n)	9/32	21/47	0,316
VKİ (kg/m ²)	25,019±3,65	26,0±4,0	0,185
Total-K (mmol/L)	4,91±1,07	5,2±1,32	0,146
TG (mmol/L)	1,72±1,16	1,61±0,74	0,565
HDL-K(mmol/L)	1,10±0,31	1,02±0,19	0,100
LDL-K(mmol/L)	3,06±0,96	3,33±1,21	0,239
VLDL-K(mmol/L)	0,64±0,23	0,76±0,34	0,068
SKB (mmHg)	122,5±17,4	137,3±34,08	0,023
DKB (mmHg)	76,03±16,5	84,70±17,98	0,023
Açlık kan şekeri (mg/dL)	101,7±16,3	172,5±125,6	0,144
Sigara Kullanımı (%)	%28,1	%58,2	0,005
Alkol kullanımı (%)	%15,4	%12,7	0,748
Aile hikayesi (%)	%50	%37,7	0,413
Tip 2 Diabet varlığı (%)	-	%38,8	-
Hipertansiyon varlığı (%)	-	%41,2	-
SVH varlığı (%)	-	%37,3	-

Tablodaki yaş, serum lipid, VKİ ve kan basınçları değerleri X+SD olarak verilmiştir. Gruplararası önemlilik derecesi student's t testi ile incelenmiştir. KKH: Koroner kalp hastalığı, VKİ : Vücut kitle indeksi, Total-K: total-kolesterol, TG: Trigliserid, HDL-K: HDL-kolesterol, LDL-K:LDL-kolesterol, VLDL-K:VLDL-kolesterol, SVH: sol ventrikül hipertrofisi, n : örnek sayısı.

Tablo 2. NUCB2/Nesfatin-1 Geninde İncelenen Polimorfizmlerin Dağılımları

NUCB2/Nesfatin-1 Geni Polimorfizmleri	Çalışma Grupları	
	Kontrol (n=37)	KKH Hasta (n=62)
rs757081 Genotipleri		
CC	16 (%43,2)	34 (%54,8)
GG	3 (%8,1)	4 (%6,5)
CG	18 (%48,6)	24 (%38,7)
HWE	p=0,503 (p>0,05)	p=0,93 (p>0,05)
rs757081 Alleleri		
C	50 (%67,57)	92 (%74,19)
G	24 (%32,43)	32 (%25,81)
rs1330 Genotipleri		
CC	19 (%48,7)	32 (%49,2)
TT	5 (%12,8)	5 (%7,7)
CT	15 (%38,5)	28 (%43,1)
HWE	p=0,465 (p>0,05)	p=0,739 (p>0,05)
rs1330 Alleleri		
C	53 (%67,95)	92 (%70,77)
T	25 (%32,05)	38 (%29,23)

n : örnek sayısı, HWE: Hardy-Weinberg Eşitliği.

Tablo 3. NUCB2/Nesfatin-1 rs757081 Genotiplerinin Çalışma Gruplarında Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi

GRUP	rs757081				
	CC	CG	GG	CC/CG	GG/CG
KONTROL	n=16	n=18	n=3	n=34	n=21
Total-K (mmol/L)	4,73±1,21	5,21±1,30	5,28±0,82	4,98±1,26	5,22±1,23
TG (mmol/L)	1,59±0,83	1,82±1,61	1,60±0,42	1,71±1,28	1,79±1,49
HDL-K (mmol/L)	1,09±0,24	1,10±0,33	1,41±0,51	1,10±0,29	1,15±0,36
LDL -K(mmol/L)	3,00±1,11	3,27±1,21	3,12±0,64	3,14±1,15	3,24±1,13
VLDL -K(mmol/L)	0,65±0,23	0,60±0,24	0,57±0,08	0,62±0,23	0,59±0,22
VKİ (kg/m²)	25,46±3,72	24,66±3,03	23,97±4,14	25,04±3,34	24,56±3,09
SKB (mmHg)	124,09±18,00	126,46±20,46	113,67±11,85	125,38±18,99	124,06±19,49
DKB (mmHg)	76,82±15,54	80,85±19,88	69,00±10,15	79,00±17,76	78,63±18,78
KKH HASTA	n=34	n=24	n=4	n=58	n=28
Total-K (mmol/L)	5,49±1,66	5,06±0,89	5,30±1,33	5,31±1,40	5,09±0,94
TG (mmol/L)	1,71±0,75	1,58±0,84	1,45±0,34	1,66±0,78	1,56±0,78
HDL-K (mmol/L)	1,02±0,23	1,01±0,15	1,18±0,12	1,02±0,20	1,04±0,15
LDL -K(mmol/L)	3,61±1,50	3,06±0,74	3,41±1,31	3,39±1,27	3,11±0,3
VLDL -K(mmol/L)	0,79±0,35	0,77±0,40	0,68±0,15	0,78±0,37	0,75±0,36
VKİ (kg/m²)	26,58±4,39	25,94±3,58	24,93±4,46	26,29±4,02	25,78±3,65
SKB (mmHg)	138,03±35,62	137,29±34,86	150,00±31,62	137,72±34,99	139,10±34,16
DKB (mmHg)	84,70±19,08	84,58±16,99	92,50±15,00	84,65±18,07	85,71±16,71

Tablodaki yaş, serum lipid, VKİ ve kan basınçları değerleri X±SD olarak verilmiştir. Gruplararası önemlilik derecesi 3 grup genotip karşılaştırmalarında One-way ANOVA testi ile yapılmıştır, 2 grup allel karşılaştırmaları ise student's t testi ile incelenmiştir. KKH: Koroner kalp hastalığı, VKİ : Vücut kitle indeksi, Total-K: total-kolesterol, TG: Trigliserid, HDL-K: HDL-kolesterol, LDL-K:LDL-kolesterol, VLDL-K:VLDL-kolesterol, n : örnek sayısı.

Tablo4. NUCB2/Nesfatin-1 rs1330 Genotiplerinin Çalışma Gruplarında Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi

GRUP	rs1330				
	CC	CT	TT	CC/CT	TT/CT
KONTROL	n=19	n=15	n=5	n=34	n=20
Total-K (mmol/L)	4,88±1,05	5,17±1,17	4,29±0,73	5,00±1,09	4,99±1,09
TG (mmol/L)	1,70±0,84	1,91±1,65	1,51±0,49	1,79±1,25	1,77±1,38
HDL-K (mmol/L)	1,12±0,21	1,07±0,38	0,95±0,15	1,10±0,29	1,03±0,32
LDL -K(mmol/L)	3,10±1,07	3,16±0,95	2,72±0,80	3,13±1,00	3,12±0,90
VLDL -K(mmol/L)	0,68±0,22	0,67±0,27	0,52±0,11	0,67±0,24	0,63±0,23
VKİ (kg/m²)	25,69±4,08	24,21±3,43	24,64±3,15	25,04±3,72	24,73±2,99
SKB (mmHg)	122,67±16,35	126,73±21,95	113,00±8,37	124,07±17,95	121,16±15,69
DKB (mmHg)	76,00±14,16	81,91±20,88	65,00±7,07	78,25±16,63	75,44±15,82
KKH HASTA	n=32	n=28	n=5	n=60	n=33
Total-K (mmol/L)	5,56±1,60	4,99±1,00	5,33±1,14	5,31±1,36	5,21±1,07
TG (mmol/L)	1,72±0,74	1,45±0,75	1,99±0,84	1,60±0,74	1,77±1,27
HDL-K (mmol/L)	1,00±0,19	1,03±0,20	1,05±0,17	1,02±0,19	1,03±0,19
LDL -K(mmol/L)	3,66±1,50 *	2,99±0,82	3,34±1,10	3,37±1,25	3,17±0,92
VLDL -K(mmol/L)	0,80±0,35	0,70±0,35	0,93±0,37	0,75±0,34	0,77±0,33
VKİ (kg/m²)	26,75±4,34	25,60±3,85	26,93±2,67	26,11±4,05	25,87±3,53
SKB (mmHg)	144,03±39,38 †	125,36±25,46	153,00±29,07	136,64±37,15	130,13±32,23
DKB (mmHg)	86,61±20,09	79,29±14,70	96,00±15,17Ω	83,52±18,01	81,25±15,60

Tablodaki yaş, serum lipid, VKİ ve kan basınçları değerleri X+SD olarak verilmiştir. Gruplar arası önemlilik derecesi 3 grup genotip karşılaştırmalarında One-way ANOVA testi ile yapılmıştır, 2 grup allel karşılaştırmaları ise student's t testi ile incelenmiştir. KKH: Koroner kalp hastalığı, VKİ: Vücut kitle indeksi, Total-K: total-kolesterol, TG: Trigliserid, HDL-K: HDL-kolesterol, LDL-K:LDL-kolesterol, VLDL-K:VLDL-kolesterol, n: örnek sayısı.

*, p=0,043; †, p=0,035; Ω, P=0,055

Tablo 5. Çalışma gruplarında Eşik Metabolik risk değerleri üzerinde NUCB2/Nesfatin-1 Genotiplerinin Etkileri

	rs757081				rs1330			
	KONTROL		HASTA		KONTROL		HASTA	
	C	GG	C	GG	C	TT	C	TT
TC\geq5,18	53	67	62	67	58,8*	0	57	0
TG\geq1,70	27	33	32	33	29,4	40	32	40
HDL\leq0,90	29	33	25	33	32,4	40	26	40
LDL\geq3,36	39	67	38	67	39,4	20	33	20
VKİ\geq27,5	27	33	40	33	27,8	18	39	18

Tablodaki değerler ”%” olarak verilmiştir. Gruplar arası önemlilik derecesi student’s t testi ile incelenmiştir. KKH: Koroner kalp hastalığı, VKİ: Vücut kitle indeksi, Total-K: total-kolesterol, TG: Trigliserid, HDL-K: HDL-kolesterol, LDL-K:LDL-kolesterol, * Fisher’s exact test, P=0,020 (C allel vs.TT genotipi Total-kolesterol \geq 5,18 \uparrow)

Tablo 6. KKH hasta grubunda cinsiyete göre lipid, kan basıncı ve VKİ değerleri

Parametre	CİNSİYET	X ± SD	P değeri
	Total-K (mmol/L)	KADIN	5,51±1,72
ERKEK		5,15±1,13	
TG (mmol/L)	KADIN	1,92±1,36	0,879
	ERKEK	1,86±1,96	
HDL-K (mmol/L)	KADIN	1,06±0,22	0,080
	ERKEK	0,99±0,19	
LDL -K(mmol/L)	KADIN	3,53±1,53	0,199
	ERKEK	3,16±0,81	
VLDL -K(mmol/L)	KADIN	0,80±0,37	0,598
	ERKEK	0,76±0,32	
SKB (mmHg)	KADIN	145,65±43,64	1,114
	ERKEK	131,27±78,75	
DKB (mmHg)	KADIN	88,06±18,87	0,098
	ERKEK	81,67±16,46	
VKİ (kg/m²)	KADIN	26,76±4,36	0,075
	ERKEK	25,17±3,37	

Tablo 7: KKH Hasta Grubunda Cinsiyete Göre NUCB2/Nesfatin-1 Genotiplerinin Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkileri

GRUP	rs757081		rs1330	
	CC	GG+CG	CC	TT+CT
KKH ERKEK	n=21	n=20	n=23	n=21
Total-K (mmol/L)	5,19±40,88	5,06±0,96	5,18±0,86	5,17±0,88
TG (mmol/L)	1,77±0,74	1,40 ±0,67	1,77±0,74	1,46±0,66
HDL-K (mmol/L)	0,96±0,20	1,03±0,13	0,95±0,19	1,04±0,14
LDL -K (mmol/L)	3,36±0,91	3,08±0,78	3,31±0,91	3,16±0,78
VLDL -K(mmol/L)	0,82±0,35	0,67±0,32	0,83±0,34	0,70±0,30
SKB (mmHg)	132,,25±22,61	133,00±35,56	140,68±32,30*	121,60±21,92
DKB (mmHg)	82,25±15,17	83,00±71,87	85,23±17,42	78,00±15,34
VKİ (kg/m²)	26,18±3,80	25,03±3,30	26,34±3,48	24,97±3,19
	rs757081		rs1330	
	CC	GG+CG	CC	TT+CT
KKH KADIN	n=13	n=8	n=9	n=12
Total-K (mmol/L)	5,96±2,42	5,26±0,93	6,53±2,52	5,28±1,34
TG (mmol/L)	1,61±0,77	1,95±0,93	1,59±0,76	2,25±1,79
HDL-K (mmol/L)	1,10±0,25	1,08±0,21	1,14±0,12	1,03±0,26
LDL -K(mmol/L)	4,00±2,09	3,19±0,98	4,49±2,24	3,17±1,14
VLDL -K(mmol/L)	0,73±0,37	0,97±0,41	0,72±0,38	0,88±0,37
SKB (mmHg)	145,38±49,77	154,38±26,38	152,22±54,40	144,33±41,53
DKB (mmHg)	88,46±24,10	92,50±11,65	90,00±26,46	86,67±14,96
VKİ (kg/m²)	27,11±5,24	27,70±4,07	27,63±5,95	27,34±3,66

Tablodaki yaş, serum lipid, VKİ ve kan basınçları değerleri X+SD olarak verilmiştir. Gruplar arası önemlilik derecesi student's t testi ile incelenmiştir. KKH: Koroner kalp hastalığı, VKİ: Vücut kitle indeksi, Total-K: total-kolesterol, TG: Trigliserid, HDL-K: HDL-kolesterol, LDL-K:LDL-kolesterol, VLDL-K:VLDL-kolesterol, n: örnek sayısı.

*, p=0,021;