

MİTOKONDRIYAL HASTALIK NEDENİYLE TETKİK EDİLEN HASTALARDA M.16189T>C DEĞİŞİKLİĞİNİN METABOLİK SENDROM AÇISINDAN İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF M.16189T> C VARIANT IN TERMS OF METABOLIC SYNDROME IN PATIENTS EXAMINED FOR MITOCHONDRIAL DISEASE

Aslı İNCİ, Filiz Başak CENGİZ ERGİN, İlyas OKUR, Gürsel BİBEROĞLU, Leyla TÜMER, Fatih Süheyl EZGÜ

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı,
Çocuk Metabolizma ve Beslenme Bilim Dalı

ÖZET

AMAÇ: Metabolik sendrom, obezite, yüksek düzeyde düşük yoğunluklu kolesterol düzeyi (LDL), trigliserit düzeyi (TG) ve insuline duyarlılık ile karakterize olan günümüzde sıklığı giderek artan bir bozukluktur. Metabolik sendromun etiopatogenezinde hem genetik hem de çevresel nedenlerin rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle mitokondriyal DNA'da oluşan m.16189T>C değişikliğinin bu hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada mitokondriyal hastalık şüphesi ile başvuran hastalarda saptanan m.16189T>C değişikliğinin klinik ve laboratuvar bulgularının incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Kliniğimize 2019 - 2020 yılları arasında mitokondriyal hastalık şüphesi ile gelen hastalardan m.16189T>C değişikliği olan hastalar çalışmaya alınmıştır. Hastaların klinik ve laboratuvar bulguları mitokondriyal hastalık şüphesi taşıması nedeniyle periferik kandan mitokondriyal DNA izolasyonu yapılmıştır. Yeni nesil DNA dizileme ile tüm mitokondriyal genom DNA dizi analizi yapılarak m.16189T>C değişikliği olan hastalar saptanarak çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastaların klinik ve laboratuvar bulguları metabolik sendrom açısından incelenmiştir.

BULGULAR: 1 yıllık süre içinde 55 hastanın 11'inde mitokondriyal genom analizinde m.16189T>C değişikliği saptanmıştır (%20). Fizik muayene bulgularında, hiçbir hastada fazla tartı ve obezite saptanmamıştır. Hastaların glukoz, LDL ve trigliserit düzeyleri normal aralıkta bulunmuştur.

SONUÇ: Hasta grubumuzda oldukça yüksek oranda saptanan bu değişikliğin metabolik sendrom ile ilişkisi gösterilememiş ve polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. Ancak mitokondriyal hastalık şüphesi ile gelen bu hastaların kullandığı ilaçların, beslenme şekillerinin ve hastalığın patofizyolojisinin bu metabolik sendromu etkileyen çevresel faktörler olabileceği ön görülebilir.

ANAHTAR KELİMELER: Metabolik sendrom, Mitokondriyal hastalık, Mitokondriyal genom analizi, M.16189T>C.

ABSTRACT

OBJECTIVE: Metabolic syndrome is an increasingly common disorder, characterized by obesity, high low-density cholesterol level (LDL), triglyceride level (TG), and insulin sensitivity. It is known that both genetic and environmental factors play a role in the etiopathogenesis of metabolic syndrome. It has shown that the m.16189T>C variant that occurs mainly in mitochondrial DNA is associated with this disease. In this study, it was aimed to examine the clinical and laboratory findings of m.16189T>C change detected in patients who applied with suspected mitochondrial disease.

MATERIAL AND METHODS: Patients with a change in m.16189T>C among the patients who came to our clinic with the suspicion of mitochondrial disease between 2019-2020 were included in the study. Mitochondrial DNA was isolated from peripheral blood because the clinical and laboratory findings of the patients were suspicious of mitochondrial disease. New generation DNA sequencing and whole mitochondrial genome DNA sequence analysis were performed and patients with m.16189T>C changes were determined and included in the study. Clinical and laboratory findings of these patients were examined in terms of metabolic syndrome.

RESULTS: M.16189T>C variant was found in mitochondrial genome analysis in 11 of 55 patients (20%). In the physical examination findings, excessive weight and obesity were not detected in any of the patients. The glucose, LDL, and triglyceride levels of the patients were within the normal range.

CONCLUSIONS: This change, which was detected at a high rate in our patient group, could not be associated with metabolic syndrome and was evaluated as a polymorphism. However, it can be predicted that the drugs used by these patients who had a suspicion of mitochondrial disease, their diet, and the pathophysiology of the disease may be the environmental factors affecting the metabolic syndrome.

KEYWORDS: Metabolic syndrome, Mitochondrial disease, Mitochondrial genome analysis, M.16189T>C .

Geliş Tarihi / Received: 26.04.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 26.10.2021

Yazışma Adresi / Correspondence: Öğr. Gör. Dr. Aslı İNCİ

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Çocuk Metabolizma ve Beslenme Bilim Dalı

E-mail: aslid.inci@gmail.com

Orcid No (Sirasıyla) : 0000-0001-5446-4140, 0000-0002-1374-5939, 0000-0002-8772-0689, 0000-0001-5948-188X, 0000-0002-7831-3184, 0000-0001-9497-3118

Etik Kurul / Ethical Committee: Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (13.11.2017/545).

GİRİŞ

Metabolik sendrom, santral obezite, artmış yüksek yoğunluklu kolesterol (LDL) ve trigliserit (TG) düzeyleri, yüksek kan basıncı ve tip II diyabete yatkınlık ile karakterize sistemik bir bozukluktur. Yaşla birlikte sıklığı artmakta olup ülkemizde metabolik sendrom, erişkin erkeklerde %28, kadınlarda ise %40 sıklıkla görülmektedir (1). Çocuk ve adolesanlarda erişkinlere kıyasla daha düşük oranda görülmesine rağmen sıklığının giderek arttığı düşünülmektedir.

İlk defa Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1998 yılında (2) metabolik sendrom tanısında insulin direncinin en önemli biyobelirteç olduğu belirtilmiş ancak sonraki yıllarda kriterlerde birtakım değişiklikler yapılarak en son santral obezitenin eşlik ettiği hiperglisemi/insulin direnci, aterojenik dislipidemi ve hipertansiyon kriterleri eklenerek son halini almıştır (3). Metabolik sendromun etiopatogenezinde nedeni açıklayabilecek tek bir faktörden bahsetmek mümkün olmamaktadır. Genetik nedenlerin ve çevresel nedenlerin (sedanter yaşam, yüksek kalorili ve karbonhidrattan zengin beslenme) birlikte rol oynadığı üzerinde durulmaktadır (4). Genetik nedenler arasında mitokondrinin kendi DNA'sı üzerinde oluşan mutasyonlar ve nükleer genlerden kaynaklanan mitokondriyal hastalıklar metabolik sendrom oluşmasında rol oynayabilmektedir.

Mitokondri kendi DNA'sı olan bu nedenle diğer organelerden ayrılan hücrenin oksidatif fosforilasyon ile adenosin trifosfat (ATP) üretiminden sorumlu ana organelidir (5). Mitokondriyal DNA'da meydana gelen bozukluklar sonucu hücre metabolizması etkilenmekte, serbest radikallerin üretimi artmakta, oksidatif fosforilasyonun bozulması ile ATP üretimi azalmaktadır.

Mitokondriyal işlev bozukluğunun diyabet ve metabolik sendrom ile ilişkisi uzun zamandır bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, mitokondriyal DNA'da meydana gelen bozukluklarda mitokondriyal işlevin bozukluğuna bağlı olarak metabolik sendrom ve insulin direncine yatkınlığın geliştiği bilinmektedir (6, 7). Mitokondrinin enerji metabolizmasındaki önemi ve bu mekanizmaların metabolik sendrom gelişimindeki rolü göz önüne alınarak bu çalışmada mitokondriyal hastalık nedeniyle tetkik edilen 55 hasta m.16189T>C değişikliği açısından taranmış ve metabolik sendrom ile ilişkisi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar

Çalışma retrospektif-olgu kontrol bir çalışma olarak planlanmıştır. On sekiz yaş altı ve mental etkilenmesi olan her hastanın vasisinden ve mental durumu iyi olan 18 yaş üstü hastalardan genetik analiz sırasında onam formu alınmıştır.

Çalışmaya, bölümümüze metabolik hastalık nedeniyle başvuran ve mitokondriyal hastalık şüphesi nedeniyle 2019 - 2020 yılları arasında tetkik edilen 55 hasta dahil edilmiştir.

Yöntem

Onam formunu takiben periferik kandan DNA izolasyonu İprep™ PureLink® gDNA Blood Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ile üreticinin protokolüne göre yapılmıştır.

DNA Dizilenmesi

Tüm mitokondriyal genomu, iki büyük fragment olacak şekilde Long PCR Enzyme Mix (Thermo-Fischer) kullanılarak amplifiye edilmiştir. Ardından, Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, Guilford, CT, South San Francisco, CA) kullanılarak DNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Bu ürünler, ready-to-go analysis kit ile the Ion PGM™ or Ion S5 platform (Life Technologies, Guilford, CT, South San Francisco, CA) cihazlarına Ion Torrent 314 ya da 316 chip (Life Technologies, Guilford, CT, South San Francisco, CA) aracılığı ile yüklenmiştir. Sonuçlar Integrative Genomics Viewer (8) programı yardımıyla incelenmiştir ve 'The Revised Cambridge Reference Sequence' referans dizi olarak kullanılmıştır. MITOMAP veri tabanı, varyantların yorumlanması ve popülasyon sıklıklarının incelenmesi için kullanılmıştır (9).

Etik Kurul

Çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır (13.11.2017/545).

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi IBM SPSS 25.0 (Armonk, NY: IBM Corp.) ve MedCalc 15.8 (Franz Faul, Universitat Kiel, Germany) istatistik paket programları kullanılarak yapıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotları (yüzde, ortalama, standart sapma, medyan, minimum-maksimum) kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 55 hastanın 11'inde m.16189T>C değişikliği saptanmıştır. Bu değişiklik için, hastaların periferik kanında %90 ve üzerindeki heteroplazmi oranı tespit edilenler çalışmaya dahil edilmiştir.

Mitokondriyal hastalık şüphesi ile gelen 55 hastadan 11 olguda m.16189T>C değişikliği saptandı. Bu olguların 6'sı erkek, 5'i de kadın hasta idi. Erkek olguların yaş ortalaması 16.5 (2- 36 yaş), kadın olguların yaş ortalaması ise 15.7 idi (1.5- 41 yaş). Olguların %36'sının aile hikayesinde anne-baba arasında akrabalık mevcuttu. En sık başvuru nedenleri kas güçsüzlüğü (%72), nöromotor gelişim geriliği (%36), nöbet (%27.7) ve hipotonydi (%27.7). Hastaların hiçbirinde obezite ve fazla tartı saptanmadı (%0). Bir hastada nöromotor gelişim geriliğine ek olarak kilo alım azlığı mevcuttu (**Tablo 1**).

Tablo 1: Hastaların demografik ve klinik özellikleri

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Akrabalık	Başvuru şikayeti	BMI (Kg/cm ²)	Tansiyon mm/Hg	Fizik Baka
H1	13,5	K	Var	Kas güçsüzlüğü, göz kapağında düşüklük	13,7	100/65	Kaslarda güçsüzlük, DTR'lerde hafif artış, bilateral pitozis
H2	41,0	K	Yok	Kas güçsüzlüğü	22,2	110/60	Kas güçsüzlüğü, tüm kaslarda hafif atrofi
H3	2,0	E	Var	Kaslarda gevşeklik, baş tutamama	19,3	90/70	Aksiyel hipotoni, DTR'lerde azalma, tüm gelişim basamaklarında gerilik, iştme kaybı
H4	3,5	E	Yok	Gelişim geriliği, nöbet	16,7	95/60	Aksiyel hipotoni, ekstremitelerde hipertoni, DTR'lerde artış, konuşma yok
H5	36,0	E	Yok	Kas güçsüzlüğü	22,5	110/65	Kaslarda güçsüzlük, DTR'lerde hafif artış
H6	21,0	E	Yok	Gürmede ilerleyici bozukluk	22,1	100/60	Görme keskinliğinde azalma
H7	1,5	K	Var	Nöbet	20,1	95/60	Aksiyel hipotoni, ekstremitelerde hipertoni, DTR'lerde artış, hepatomegali
H8	5,0	E	Yok	Kas güçsüzlüğü, nöbet, kilo alamama	13,7	100/60	Aksiyel hipotoni, ekstremitelerde hipertoni, DTR'lerde hafif artış, konuşma yok
H9	1,5	K	Var	Nöbet	14,7	95/60	Aksiyel hafif hipotoni
H10	32,0	E	Yok	Kas güçsüzlüğü	22,3	115/65	Kas güçsüzlüğü
H11	33,0	K	Yok	Kas güçsüzlüğü, nöbet	22,4	110/65	Kas güçsüzlüğü

H: Hasta, K: Kadın, E: Erkek, DTR: Derin tendon refleksi

H1 mt.13135G>A değişikliği. MITOMAP veri tabanında sağlıklı bireylerde de rastlanabilen bir değişiklik olarak tanımlanmasına karşın hipertrofik kardiyomyopatiye yakınlığı arttırdığına dair veriler de bulunmaktadır (Wei Y, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 36 (9): 933-939, 2009).

H4 baha wes normal

H7 450 cccin c.718G>A p.Asp240Asn Porphyria, acute, intermittent

H8 cfc tokkaya POLG (Progressif eksternal oftalmopleji-Mitokondriyal DNA depleksiyon sendromu, OD-OR) geninde p.Ser36Ala (c.105_107delCA(GinsAGC)) (Heterozigot)

H9 450 normal

Hastaların fizik muayenelerinde en belirgin bulgu tüm ekstremitelerde olmak üzere kas gücünde 3/5-4/5 azalma (%45), aksiyel hipotoni (%45), ve derin tendon reflekslerinde artışı (%45). Bir hastada bilateral pitozis [Hasta (H) 1] belirgindi. Bir hastada nörogelişimsel geriliğe ek olarak iştme kaybı (H3) mevcuttu. Bir hastanın görme keskinliğinde azalma dikkati çekmekteydi (H6). Bir hastada aksiyel hipotonisiteye ek olarak (karaciğer kot altı 3 cm) hepatomegali saptandı.

Olguların laboratuvar incelemelerinde hemogram ve periferik yayma değerlendirmesinde patolojik bir bulguya rastlanmadı. Hastaların glukoz değerleri 78-100 mg/dL (ortalama±standart sapma 88,36±8,00), LDL kolesterol düzeyleri 78-116 mg/dL (ortalama±standart sapma 98,27±13,30), trigliserit düzeyleri 79-137 mg/dL (ortalama±standart sapma 110,00±20,60) arasında değişmekteydi. (**Tablo 2**).

Tablo 2: Hastaların metabolik sendrom açısından değerlendirilen biyokimyasal parametreleri

Hasta	Glukoz (mg/dL)	LDL (mg/dL)	TG (mg/dL)
H1	91	78	85
H2	87	89	79
H3	79	101	93
H4	98	99	125
H5	89	111	129
H6	96	110	101
H7	100	87	95
H8	79	98	132
H9	82	80	126
H10	78	116	137
H11	93	112	108

H: Hasta, LDL: Düşük yoğunluklu kolesterol, TG: Trigliserit

Bir hastanın (H3) karaciğer işlev testlerinden alanin aminotransferaz düzeyi (88 U/L, normal: 0-35 U/L), aspartate aminotransferaz düzeyinde (67 U/L, normal: 0-35 U/L) artış dışında kanama parametrelerinde ve diğer biyokimyasal analizlerde artış saptanmadı. Görme keskinliğinde azalma (H6) olan hasta dışında, tüm hastaların kan laktat düzeyleri 2 mmol/L'nin üstünde bulundu (%91). Kantitatif amino asit analizlerinde alanin düzeyleri (%91 hastada) yüksek saptandı. İdrar organik asit analizinde (%91 hastada) hafif laktik asit ile birlikte, suberik asit, sebasik asit atılımı mevcuttu.

TARTIŞMA

Mitokondriyal DNA'daki bozukluklar, mitokondrinin enerji üretiminde azalma, reaktif oksijen radikallerinin artmasına ve pankreatik beta hücrelerinde değişikliğe neden olarak metabolik sendrom gelişiminde rol oynamaktadır. Metabolik sendrom, pek çok genetik ve çevresel etmeden etkilenen multifaktöriyel bir bozukluktur. Metabolik sendromun genetik etiolojisinde mitokondri ile en fazla ilişkilendirilen m.16189T>C değişikliği olup insulin direnci ve obeziteye neden olabildiği üzerinde uzun zamandır durulmaktadır (10, 11). Ancak çalışmamızda hiçbir hastada m.16189T>C değişikliğinin metabolik sendrom ile ilişkisi gös-

terilememiştir. Metabolik sendromlu bireylerde yapılan çalışmalarda m.16189T>C değişikliğinin gösterilememesi bu değişikliğin daha çok polimorfizm olduğunu ve hastalıkla ilişkisinin zayıf olduğunu göstermektedir (12 - 14). Çalışmamızda da gösterdiğimiz üzere m.16189T>C değişikliğinin metabolik sendrom ile ilişkisinin olmaması, Asya toplumunda sıklığının fazla olması ile ilişkilendirilebilir (15). Bizim çalışmamızda da bu değişikliğin yalnızca 1 yıllık süre içerisinde mitokondriyel hastalık şüphesi ile incelenen hastalardan çalışıldığı düşünülürse sıklığın oldukça fazla olduğu düşünülebilir (%20). Aynı zamanda mitokondriyel hastalıklar oldukça karmaşık bir patofizyolojiye sahip olup bu hastaların beslenmesi, aldıkları ilaçlar ve hastalığa bağlı katabolizmada metabolik sendromu destekleyen klinik ve laboratuvar bulguların oluşumunu engellemiş olabilmektedir. Metabolik sendromun daha çok adolesan ve erişkin dönemi etkilediği göz önüne alınırsa hastalarımızın 6'sının çocuk, 5'inin erişkin dönemde olması nedeniyle m.16189T>C değişikliğinin hasta grubunda metabolik sendroma neden olmadığı ancak periyodik aralıklarla metabolik sendrom açısından yakın takip edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Hasta bireylerde saptanan bu değişikliğin, metabolik sendrom ile ilişkisinin gösterilebilmesi için sağlıklı ve metabolik sendromu olan bireyleri içerecek şekilde geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu sendromun kalıtsal temelini daha iyi anlaşılabilmesi için prospektif genetik ve fonksiyonel çalışmalarla m.16189T>C değişikliğinin araştırılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Tüm hasta ve hasta yakınlarına, hastaları takip eden tüm doktor ve sağlık çalışanlarına, genetik ve biyokimyasal analizlerin çalışılmasında görev alan tüm biyolog arkadaşlarımıza teşekkür ediyoruz.

KAYNAKLAR

1. Kozan O, Oguz A, Abaci A, et al. Prevalence of the metabolic syndrome among Turkish adults. *Eur J Clin Nutr.* 2007; 61(4): 548-53.
2. Alberti KG and Zimmet, PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;(15):539-53.
3. Paul L, Huang A. comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms.* 2009;(2):231-7.
4. Ordovas JM. Genetic links between diabetes mellitus and coronary atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2007;(9):204-10.
5. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet.* 2005; (6): 389-402.
6. Palmieri VO, De Rasmio D, Signorile A, et al. T16189C mitochondrial DNA variant is associated with metabolic syndrome in Caucasian subjects *Nutrition.* 2011;27(7-8):773-7.
7. Saldana-Rivera, E, Careaga-Castilla MJ, Olvera-Cardenas GD, et al. Mitochondrial T16189C polymorphism is associated with metabolic syndrome in the Mexican population *Disease Markers.* 2018;(25):2018:3981315.
8. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;(29):24-6.
9. Lott MT, Leipzig JN, Derbeneva O, et al. mtDNA variation and analysis using MITOMAP and MITOMASTER. *Current Protocols in Bioinformatics.* 2013;1(123): 1-26.
10. Liou CW, Lin TK, Huei Weng H, et al. A common mitochondrial DNA variant and increased body mass index as associated factors for development of type 2 diabetes: Additive effects of genetic and environmental factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(1):235-9.
11. Ji L, Gao L, Han X. Association of 16189 variant (T->C transition) of mitochondrial DNA with genetic predisposition to type 2 diabetes in Chinese populations. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2001;(81): 711-4.
12. Chinnery PF, Elliott HR, Patel S, et al. Role of the mitochondrial DNA 16184-16193 poly-C tract in type 2 diabetes. *Lancet.* 2005;(366):1650-1.
13. Gill-Randall R, Sherratt EJ, Thomas AW, et al. Analysis of a polycytosine tract and heteroplasmic length variation in the mitochondrial DNA D-loop of patients with diabetes, MELAS syndrome and race-matched controls. *Diabet Med.* 2001;(18):413-16.
14. Das S, Bennett AJ, Sovio U, et al. Detailed analysis of variation at and around mitochondrial position 16189 in a large Finnish cohort reveals no significant associations with early growth or metabolic phenotypes at age 31 years. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;(92): 3219-23.
15. Wang PW, Lin TK, Weng SW, et al. Mitochondrial DNA variants in the pathogenesis of type 2 diabetes - relevance of asian population studies. *Rev Diabet Stud.* 2009;(6): 237-46.