

## Συσχέτιση του πολυμορφισμού Pro12Ala του γονιδίου PPAR $\gamma$ με την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 στην Κεντρική Μακεδονία

**A. Τυχάλας<sup>1</sup>**

**A. Σάτσογλου<sup>1</sup>**

**K. Σουλής<sup>2</sup>**

**I. Τσοχατζής<sup>1</sup>**

**A. Κουβάτση<sup>3</sup>**

**K. Τριανταφυλλίδης<sup>3</sup>**

### Περίληψη

Ο μεταγραφικός παράγοντας PPAR $\gamma$  εμπλέκεται στις διαδικασίες της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων, καθώς και στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων. Ένας συχνός πολυμορφισμός του γονιδίου του PPAR $\gamma$ , Pro 12Ala, έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2, καθώς και με το σωματικό βάρος, την ινσουλινοαντίσταση, την αρτηριακή πίεση και πολλές άλλες κλινικές και βιοχημικές παραμέτρους. Σκοπός της μελέτης μας ήταν η διερεύνηση της συχνότητας εμφάνισης του πολυμορφισμού Pro12Ala και της επίπτωσής της στην εμφάνιση ΣΔΤ2 στον ελληνικό πληθυσμό. Μελετήθηκαν 72 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και 31 υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου) στην περιοχή ευθύνης του Νοσοκομείου Γουμένισσας του νομού Κιλκίς. Στους διαβητικούς διαπιστώθηκε μικρότερη συχνότητα του πολυμορφισμού (3,5% έναντι 10%,  $p < 0,01$ ) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στους διαβητικούς ασθενείς, η παρουσία του πολυμορφισμού συσχετίστηκε με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) ( $p < 0,05$ ), χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης ορού νηστείας ( $p < 0,05$ ) και υψηλότερη συστολική αρτηριακή πίεση (ΣΑΠ) ( $p < 0,01$ ). Όσον αφορά την ανταπόκριση των διαβητικών στη χορήγηση θειαζολιδινοδίωνης, ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε με σημαντικά μεγαλύτερη μείωση της ΣΑΠ στο τέλος του πρώτου μήνα από την έναρξη της θεραπείας ( $p < 0,01$ ) που όμως έπαυε να υφίσταται μετά από έξι μήνες αγωγής. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο πολυμορφισμός Pro12Ala προστατεύει από την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 στον ελληνικό πληθυσμό και επηρεάζει ορισμένα κλινικά χαρακτηριστικά στους διαβητικούς ασθενείς.

### Εισαγωγή

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (T2DM) αποτελεί το συχνότερο μεταβολικό νόσημα. Χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, τα οποία, αν αφεθούν χωρίς θεραπεία, μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρότατες επιπλοκές, οξείες ή χρόνιες, που είναι υπεύθυνες για το μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης και την κατώτερη ποιότητα ζωής των διαβητικών ασθενών. Πρόκειται για ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της δημόσιας υγείας, αφού έχουν προσβληθεί περίπου 120 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Διαβητολογικό Ιατρείο Παθολογικής Κλινικής ΓΝΝ-ΚΥ Γουμένισσας

<sup>2</sup> Διαβητολογικό Ιατρείο Β' Παθολογικής Κλινικής ΓΠΝΘ Γ. Παπανικολάου

<sup>3</sup> Σχολή Θετικών Επιστημών Τμήμα Βιολογίας ΑΠΘ

Με εξαίρεση τα σύνδρομα MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) και τις περιπτώσεις που οφείλονται σε βλάβες του μιτοχονδριακού DNA, ο T2DM αποτελεί μία πολυγονιδιακή νόσο, στην εκδήλωση της οποίας συμμετέχει αποφασιστικά η επίδραση του περιβάλλοντος (παχυσαρκία, δίαιτα πλούσια σε λιπαρά<sup>2</sup> και έλλειψη σωματικής άσκησης). Μπορεί να έχουν επιτευχθεί ποικίλες συσχετίσεις με μεγάλο αριθμό γονιδίων, αλλά τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών δεν είναι πάντα επαναλήψιμα και συχνά είναι και αντικρουόμενα μεταξύ τους.

Πολλές εργασίες έχουν δημοσιευθεί με θέμα τη συσχέτιση του T2DM με πολυμορφισμούς του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Peroxisome Proliferator-Activated Protein  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )<sup>3-5</sup>. Η πρωτεΐνη PPAR $\gamma$  είναι μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται από διάφορα λιπαρά οξέα. Επηρεάζει ποικιλοτρόπως την κυτταρική λειτουργία, έχοντας μεγάλο εύρος δράσεων στον οργανισμό (Πίν. 1).

Η κυριότερη, ίσως, και καλύτερα μελετημένη δράση του PPAR $\gamma$  είναι η ρύθμιση του λιπώδους ιστού<sup>3,4</sup>. Ο PPAR $\gamma$  μπορεί *in vitro* να προκαλέσει τη διαφοροποίηση ινοβλαστών ή μυϊκών κυττάρων σε λιπώδη κύτταρα. Παράλληλα, ο PPAR $\gamma$  ωθεί τα μεγάλα λιποκύτταρα σε απόπτωση, οδηγώντας έτσι στην επικράτηση των μικρού μεγέθους λιποκυττάρων στο λιπώδη ιστό.

Ο PPAR $\gamma$  έχει και πολλές άλλες δράσεις στο λιπώδη ιστό<sup>3,4</sup>. Έτσι, μειώνει την έκφραση της λεπτίνης και ανταγωνίζεται την δράση του TNF $\alpha$ , εννοώντας τη δράση της ινσουλίνης και την αύξηση του σωματικού βάρους. Λειτουργικές θέσεις σύνδεσης του PPAR $\gamma$  υπάρχουν στους προαγωγείς πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, την αποθήκευση λίπους και τη ρύθμιση του μεταβολισμού. Παραδείγματα αποτελούν η *aP2*, η φωσφοενολοπυρουβική καρβοξυκινάση (PEPCK), η ακυλοCoA συνθετάση (ACS), η πρωτεΐνη μεταφοράς των λιπαρών οξέων-1 (FATP-1) και η λιποπρωτεϊνική λιπάση. Επομένως ο PPAR $\gamma$

διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη συντονισμένη αντίδραση «αφθονίας» (thrifty response).

Μια άλλη δράση του PPAR $\gamma$ , η οποία αποτελεί και το αντικείμενο της παρούσας εργασίας, είναι η ρύθμιση της ομοιοστασίας της γλυκόζης και κυρίως η ρύθμιση της ευαισθησίας των ιστών στην ινσουλίνη<sup>3,4</sup>. Ο μυϊκός ιστός είναι υπεύθυνος για το 90% της πρόσληψης της γλυκόζης. Δεν είναι ξεκάθαρο πώς η ενεργοποίηση του PPAR $\gamma$  βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη των μυϊκών κυττάρων, καθώς μόνο ίχνη του PPAR $\gamma$  εκφράζονται στο μυϊκό ιστό. Πιθανόν, οι ποσότητες αυτές να επαρκούν. Εναλλακτική ερμηνεία είναι ότι η ενεργοποίηση του PPAR $\gamma$  οδηγεί στη δημιουργία ενός σήματος που προέρχεται από το λιπώδη ιστό και επηρεάζει την ευαισθησία στην ινσουλίνη του μυϊκού ιστού. Το σήμα αυτό μπορεί να έχει τη μορφή κυτοκινών. Δύο τέτοιοι μεσολαβητές πιθανόν να είναι ο TNF $\alpha$  και η λεπτίνη. Άλλοι μεσολαβητές του σήματος ενδέχεται να είναι τα λιπαρά οξέα. Η ενεργοποίηση της LPL, της FATP-1 και της ACS στα λιπώδη κύτταρα αλλά όχι και στα μυϊκά, αυξάνει την κάθαρση των λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό, δημιουργώντας μια «κλοπή λιπαρών οξέων». Η μειωμένη αυτή πρόσληψη λιπαρών οξέων από τα μυϊκά κύτταρα μπορεί να βελτιώνει την ευαισθησία τους στην ινσουλίνη. Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι αγωνιστές του PPAR $\gamma$  επιδρούν άμεσα στην ομοιοστασία της γλυκόζης, αυξάνοντας την έκφραση του μεταφορέα της γλυκόζης GLUT-4 και της πρωτεΐνης που σχετίζεται με την c-Cbl (c-Cbl Associated Protein-CAP).

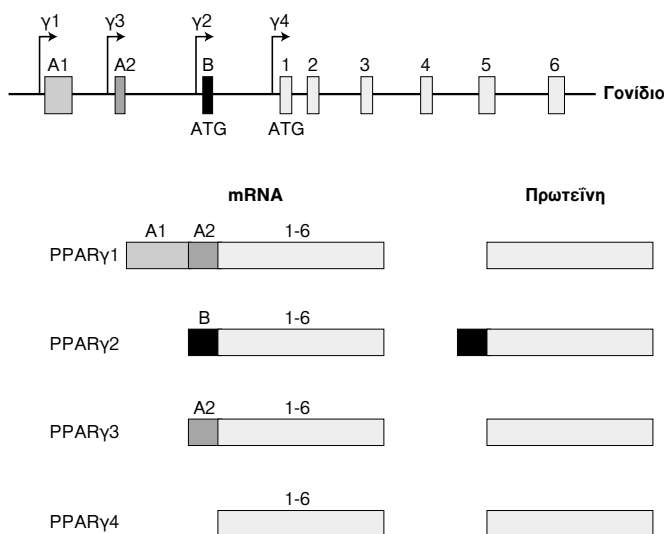
Το γονίδιο που κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα PPAR $\gamma$  εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του τρίτου χρωμοσώματος (χρωμοσωμική περιοχή 3p25), καταλαμβάνοντας έκταση μεγαλύτερη από 100 kb. Αποτελείται από 9 εξόνια, η εναλλακτική συρραφή των οποίων οδηγεί στη δημιουργία τεσσάρων διαφορετικών μορίων mRNA<sup>6</sup> (Εικ. 1). Η μετάφραση των μορίων mRNA PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 3 και PPAR $\gamma$ 4 οδηγεί στη σύνθεση της ίδιας πρωτεΐνης, ενώ η μετάφραση του mRNA PPAR $\gamma$ 2 οδηγεί στη σύνθεση πρωτεΐνης που έχει 28 επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό της άκρο. Επομένως υπάρχουν δύο ισομορφές του μεταγραφικού παράγοντα: ο PPAR $\gamma$ 1 και ο PPAR $\gamma$ 2. Το πρόσθετο τμήμα της πρωτεΐνης PPAR $\gamma$ 2 κωδικοποιείται από το εξόνιο B. Παρόλο που τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από το εξόνιο B δεν είναι απαραίτητα για τη δράση του PPAR $\gamma$  ως μεταγραφικού παράγοντα, το αμινοτελικό άκρο του PPAR $\gamma$ 2 βρέθηκε

#### Πίνακας 1. Δράσεις του PPAR $\gamma$

---

Διαφοροποίηση των λιποκυττάρων
Μεταβολισμός λιπιδίων
Ευαισθησία στην ινσουλίνη (GLUT-4)
Φλεγμονή
Αθηρωμάτωση
Ανοσοποιητικό
Κυτταρικός κύκλος – Καρκινογένεση

---



Εικ. 1. Το γονίδιο PPAR $\gamma$  και τα προϊόντα της μεταγραφής και της μετάφρασής του (τροποποιημένο από [3] και [6]).

να είναι 5-6 φορές δραστικότερο από το αμινοτελικό άκρο του PPAR $\gamma$ 1<sup>7</sup>. Η αλληλουχία των 13 πρώτων αμινοξέων του PPAR $\gamma$ 2 είναι εξελικτικώς συντηρημένη σε ποντικό, χοίρο, αγελάδα και άνθρωπο, υποδεικνύοντας ότι είναι εξαιρετικά σημαντική *in vivo*<sup>3</sup>.

Ιδιαίτερα έχει μελετηθεί η συσχέτιση του T2DM με τον πολυμορφισμό Pro12Ala, ο οποίος ταυτοποιήθηκε από τους Yen *et al* (1997)<sup>8</sup>. Συνίσταται στην αντικατάσταση μιας κυτοσίνης (C) από μια γουανίνη (G) στη θέση 34 του εξόνιου B του γονιδίου του PPAR $\gamma$ . Ο πολυμορφισμός αυτός οδηγεί στην αντικατάσταση της τριπλέτας CCA, που κωδικοποιεί το αμινοξύ προλίνη (Pro), από την τριπλέτα GCA, που κωδικοποιεί το αμινοξύ αλανίνη (Ala). Επειδή εντοπίζεται στο εξόνιο B, το οποίο μεταγράφεται μόνο στο mRNA του PPAR $\gamma$ 2, το τελικό αποτέλεσμά του, δηλαδή η αντικατάσταση ενός μορίου προλίνης από ένα μόριο αλανίνης, εκφράζεται μόνο στην ισομορφή PPAR $\gamma$ 2. Το μόριο του PPAR $\gamma$ 2 που προκύπτει φέρει Ala αντί Pro στη θέση 12 της αλληλουχίας των αμινοξέων και παρουσιάζει μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα<sup>9</sup>.

Η συχνότητα του πολυμορφισμού Pro12Ala κυμαίνεται μεταξύ 0,01 και 0,22 ανάλογα με τον πληθυσμό<sup>8,10-44</sup>. Ο πολυμορφισμός είναι συχνότερος στους λευκούς Ευρωπαίους και Αμερικανούς, με μέγιστη παρατηρούμενη συχνότητα στους Φινλανδούς και σπανιότερος στους Αφρικοαμερικανούς, καθώς και στα άτομα της κίτρινης φυλής, με ελάχιστη συχνότητα στους Κινέζους. Σε αρκετές δημοσιεύσεις έχει συσχετισθεί με την παχυ-

σαρκία και τον T2DM, καθώς και με νεοπλασίες. Αναλυτικότερα, έχουν επιτευχθεί συσχετίσεις, κυρίως με προστασία από την εμφάνιση T2DM<sup>12,14,17,23,45,46</sup>, με αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη<sup>12,15,25,26,45,47-51</sup>, με μειωμένα επίπεδα γλυκόζης αίματος νηστείας<sup>14-16,52</sup>, με προδιάθεση σε παχυσαρκία και πρόωμη εμφάνισή της<sup>11,14,16,18-22,53,54</sup>, με επιδράσεις στο μεταβολισμό των λιπιδίων και τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών στο αίμα<sup>16-18,28-30,45,46,51,52,55-57</sup> (κυρίως μείωση των τριγλυκεριδίων και αύξηση της ολικής χοληστερόλης), με αυξημένη συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση<sup>16,17</sup>, με προστασία από διαβητική νεφροπάθεια<sup>31</sup>, με αυξημένα επίπεδα λεπτίνης<sup>21,53,58</sup>, με απώλεια της συσχέτισης του χαμηλού βάρους γέννησης με τον T2DM<sup>15</sup>, με μειωμένη συχνότητα νεφρικού καρκινώματος<sup>32</sup> και με αυξημένη συχνότητα πολύμορφου γλοιοβλαστώματος<sup>33</sup>.

Τα αποτελέσματα των μελετών που αφορούν τον πολυμορφισμό Pro12Ala είναι μη επαναλήψιμα και συχνά αντικρουόμενα. Σε αρκετές έρευνες δεν διαπιστώθηκε καμία συσχέτιση είτε με τον T2DM και τα επιμέρους χαρακτηριστικά του είτε με τη παχυσαρκία και τα επιμέρους χαρακτηριστικά της. Σε μια μελέτη βρέθηκε συσχέτιση με προδιάθεση σε T2DM (σε μια φυλή Ινδιάνων<sup>10</sup>), ενώ σε μια άλλη διαπιστώθηκε συσχέτιση με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος (BMI) σε παχύσαρκους άνδρες και μειωμένο BMI σε κανονικού βάρους άνδρες (σε Δανούς<sup>11</sup>). Αυτό οφείλεται στο ότι τα αποτελέσματα επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες<sup>59</sup>, όπως η παχυσαρκία, η εθνικότητα, ο τρόπος ζωής και ιδιαίτερα η αναλογία κορεσμένων/

ακόρεστων λιπών στη δίαιτα, το γενετικό υπόβαθρο και το φύλο των ατόμων που συμμετείχαν στις μελέτες αυτές.

### Ο σκοπός της έρευνας

Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της συχνότητας του πολυμορφισμού στον Ελληνικό πληθυσμό, καθώς και η διαπίστωση τυχόν συσχετίσεων του τόσο με την εμφάνιση T2DM όσο και με τα κλινικά του χαρακτηριστικά.

### Ασθενείς και μέθοδοι

Η δειγματοληψία διεξήχθη κατά την περίοδο Φεβρουαρίου-Μαΐου 2002 στην περιοχή που καλύπτεται υγειονομικά από το Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο – Κέντρο Υγείας Γουμένισσας (ΓΝΝ-ΚΥ Γουμένισσας).

### Άτομα

Τα άτομα που συμπεριελήφθησαν στην έρευνα διακρίθηκαν σε δύο κατηγορίες:

1) Διαβητικοί πάσχοντες από T2DM που διαμένουν στην ευρύτερη περιοχή του Δήμου Γουμένισσας του Νομού Κιλκίς (Πληθυσμός Α):

Ο χαρακτηρισμός τους ως διαβητικών ατόμων έγινε με βάση τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO)<sup>60</sup> (Πίν. 2). Επιλέχθηκαν 72 άτομα.

2) Ομάδα ελέγχου από το γενικό πληθυσμό της Κεντρικής Μακεδονίας (Πληθυσμός Δ):

Χρησιμοποιήθηκαν 25 δείγματα DNA που είχαν ληφθεί παλαιότερα από υγιή άτομα του πληθυσμού της Κεντρικής Μακεδονίας. Τα άτομα αυτά δεν είχαν ιστορικό γλυκοζουρίας, εξέτασης με γλυκόζη πλάσματος νηστείας >110 mg/dl ή παθολογικής δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης.

### Κριτήρια αποκλεισμού

Προκειμένου να αποκλειστούν από τη μελέτη ασθενείς που έπασχαν από αυτοάνοσο ΣΔ (T1DM και LADA), δευτεροπαθή ΣΔ, ή από μονογονιδια-

### Πίνακας 3. Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη

- Έναρξη ΣΔ σε ηλικία < 40 ετών
- Έναρξη ινσουλινοθεραπείας σε διάστημα < 1 έτος από τη διάγνωση του ΣΔ
- Έπαρξη εξέτασης με (+) αντιησιδιακά αντισώματα
- Έπαρξη εξέτασης με τιμές του C-πεπτιδίου κάτω από τις φυσιολογικές
- Υποψία δευτεροπαθούς ΣΔ (π.χ. ιστορικό παγκρεατίτιδας, λήψης στεροειδών)
- Παρουσία κληρονομίας του ΣΔ κατά επικρατούντα χαρακτηριστικά στο γενεαλογικό δέντρο
- Παρουσία μητρικής κληρονομίας του ΣΔ στο γενεαλογικό δέντρο

κή μορφή ΣΔ (σύνδρομο MODY και βλάβες του μιτοχονδριακού DNA), θεσπίστηκαν ορισμένα κριτήρια αποκλεισμού (Πίν. 3). Η εφαρμογή τους οδήγησε στον αποκλεισμό ενός ασθενούς, ο οποίος διαπιστώθηκε ότι έπασχε από δευτεροπαθή ΣΔ. Το άτομο αυτό εμφάνισε ΣΔ, αφού υπέστη επεισόδιο βαριάς οξείας παγκρεατίτιδας και υποβλήθηκε σε επέμβαση υφολικής παγκρεατεκτομής, καταστάσεις που αποτελούν αίτια δευτεροπαθούς ΣΔ.

### Μετρήσεις

Στα άτομα που επιλέχθηκαν:

1) Μετρήθηκαν οι ακόλουθες **ανθρωπομετρικές και κλινικές παράμετροι**: ύψος, βάρος, δείκτης μάζας σώματος (BMI), περιφέρεια μέσης (ΠΜ), περιφέρεια γλουτών (ΠΓ), λόγος περιφέρειας μέσης/περιφέρεια γλουτών (ΠΜ/ΠΓ) (ως μέτρο της ύπαρξης κεντρικής παχυσαρκίας), συστολική αρτηριακή πίεση (ΣΑΠ) και διαστολική αρτηριακή πίεση (ΔΑΠ).

2) Ελέγχθηκαν στοιχεία από το **ιστορικό** των ατόμων για παρουσία άλλων σοβαρών νόσων ή καταστάσεων, όπως αρτηριακή υπέρταση και υπερχοληστελαιμία, καθώς και για ύπαρξη διαβητικών συγγενών. Ειδικά στους διαβητικούς ελέγχθηκαν επιπλέον η διάρκεια του ΣΔ, η ηλικία διάγνωσης του ΣΔ, το είδος της αντιδιαβητικής θεραπείας (δίαιτα – αντιδιαβητικά δισκία – ινσουλίνη), η εμφά-

Πίνακας 2. Κριτήρια WHO για την ανοχή γλυκόζης

		Ανοχή Γλυκόζης		
		Φυσιολογική	Διαταραγμένη	ΣΔ
Γλυκόζη ορού	(mg/dl)	< 110	≥110 και <126	≥ 126
	(mmol/l)	< 6,1	≥6,1 και <7	≥ 7
Γλυκόζη αίματος	(mg/dl)	< 100	≥100 και <110	≥ 110
	(mmol/l)	< 5,6	≥5,6 και <6,1	≥ 6,1

νιση επιπλοκών του ΣΔ, όπως στεφανιαία νόσος και αμφιβληστροειδοπάθεια και τα συνυπάρχοντα νοσήματα.

3) Μετρήθηκαν οι ακόλουθες **βιοχημικές παράμετροι**: η γλυκόζη πλάσματος νηστείας, η ολική χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια. Στους διαβητικούς μετρήθηκε επιπλέον η γλυκοσυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA<sub>1c</sub>).

### Προστασία απορρήτου

Κάθε άτομο που συμμετείχε στην έρευνα ενημερώθηκε αναλυτικά για τους σκοπούς της παρούσας έρευνας και έδωσε προφορική συγκατάθεση για την πραγματοποίηση της αιμοληψίας και την ανάλυση του γενετικού του υλικού. Προκειμένου να διατηρηθεί η ανωνυμία των συμμετεχόντων και να προστατευθεί τόσο το ιατρικό απόρρητο όσο και τα προσωπικά τους δεδομένα, αμέσως μετά την αιμοληψία και τη λήψη του ιατρικού ιστορικού, σε κάθε δείγμα αίματος αποδόθηκε κωδικός που αντιστοιχίζει το δείγμα με το άτομο από το οποίο προέρχεται.

### Συλλογή υλικού

Από κάθε άτομο που συμμετείχε στην έρευνα έγινε λήψη 10 ml ολικού περιφερικού αίματος μέσα σε σωλήνες, η εσωτερική επιφάνεια των οποίων ήταν επικαλυμμένη με EDTA. Η διατήρηση του αίματος μέχρι την απομόνωση του DNA από αυτό έγινε σε θερμοκρασία 4°C (ψυγείο) για χρονικό διάστημα που σε καμία περίπτωση δεν υπερέβη τις δέκα ημέρες.

### Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με την κλασική μέθοδο, κατά την οποία το DNA απομονώνεται από τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος, μετά από τέσσερα στάδια που περιλαμβάνουν αρχικά την ωσμωτική λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ακολούθως την ωσμωτική λύση των λευκών αιμοσφαιρίων, στη συνέχεια την κατακρήμνιση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών και πρωτεϊνών και τελικά τη συλλογή του καθαρού DNA.

### Ανάλυση DNA

Ο πολυμορφισμός Pro12Ala του γονιδίου PPAR $\gamma$  μελετήθηκε με τη μέθοδο της **αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε συνδυασμό με ανίχνευση πολυμορφισμού μήκους θραύσματος από ένζυμο περιορισμού** (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism – **PCR-RFLP**). Η μέθοδος αυτή συνίσταται σε:

1) Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου PPAR $\gamma$  που περιέχει τον πολυμορφισμό με τη μέθοδο της **αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης** (polymerase chain reaction – **PCR**). Επιλέγεται κατάλληλο ζεύγος εκκινητών ώστε το προϊόν της PCR να περιέχει θέση αναγνώρισης συγκεκριμένου ενζύμου περιορισμού μόνο παρουσία του πολυμορφισμού Pro12Ala. Στην περίπτωσή μας, ο ένας από τους δύο εκκινητές εισάγει σημειακή μετάλλαξη, προκειμένου να δημιουργηθεί η θέση αναγνώρισης.

2) Πέψη του προϊόντος της PCR με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Το προϊόν της PCR υφίσταται πέψη μόνον εφόσον υπάρχει ο πολυμορφισμός.

3) Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της πέψης.

4) Ανάλυση των διαφόρων προτύπων πέψης που παρατηρούνται.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα:

#### Πρωτόκολλο A<sup>8</sup>:

Πραγματοποιείται PCR με τους ακόλουθους εκκινητές:

– f1: 5'-GCCAATTCAAGCCCAGTC-3' και

– r1: 5'-GATATGTTTGCAGACAGTGTATCA-GTGAAGGAATCGCTTTCCG-3'

Παράγεται προϊόν PCR, το οποίο έχει μήκος 270 bp. Ακολουθεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού *BstU-I*. Παρουσία του πολυμορφισμού παράγονται δύο θραύσματα μήκους 227 bp και 43 bp, ενώ απουσία του πολυμορφισμού το προϊόν της PCR παραμένει ακέραιο. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2,5% με βρωμιούχο αιθίδιο και παρατήρηση της πηκτής σε υπεριώδες φως. Υπάρχουν οι ακόλουθες περιπτώσεις:

α) Άτομα ομόζυγα για το συχνό αλληλόμορφο εμφανίζουν μόνο μία ζώνη, αυτή των 270 bp.

β) Άτομα ομόζυγα για τον πολυμορφισμό εμφανίζουν δύο ζώνες, αυτές των 227 bp και των 43 bp.

γ) Άτομα ετερόζυγα θα εμφανίσουν και τις τρεις ζώνες, των 270bp, των 227 bp και των 43 bp.

#### Πρωτόκολλο B<sup>12</sup>:

Πραγματοποιείται PCR με τους ακόλουθους εκκινητές:

– f2: 5'-TCTGGGAGATTCTCCTATTGGC-3' και

– r2: 5'-CTGGAAGACAACACTACAAGAG-3'.

Παράγεται προϊόν PCR, το οποίο έχει μήκος 154 bp. Ακολουθεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού *HhaI*. Παρουσία του πολυμορφισμού παράγονται δύο θραύσματα μήκους 132 bp και 22 bp, ενώ απουσία του πολυμορφισμού το προϊόν της PCR

παραμένει ακέραιο. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2,5% με βρωμιούχο αιθίδιο και παρατήρηση της πηκτής σε υπεριώδες φως. Υπάρχουν οι ακόλουθες περιπτώσεις:

α) Άτομα ομόζυγα για το συχνό αλληλόμορφο εμφανίζουν μόνο μία ζώνη, αυτή των 154 bp.

β) Άτομα ομόζυγα για τον πολυμορφισμό εμφανίζουν δύο ζώνες, αυτές των 132 bp και των 22 bp.

γ) Άτομα ετεροζυγα θα εμφανίσουν και τις τρεις ζώνες, των 154 bp, των 132 bp και των 22 bp.

### Στατιστική Ανάλυση

Πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες αναλύσεις:

1) Υπολογίστηκαν οι απλές στατιστικές παράμετροι:

α) Η απόλυτη τιμή, η αναλογία, η συχνότητα μη συνεχών μεταβλητών, όπως η παρουσία του πολυμορφισμού, το φύλο, η παρουσία κάποιων νόσων, όπως η αρτηριακή υπέρταση και η υπερχοληστελαιμία, ή κάποιων επιπλοκών, όπως η στεφανιαία νόσος και η αμφιβληστροειδοπάθεια κ.α.

β) Ο μέσος όρος (Mean), η σταθερά απόκλιση (Standard Deviation – SD), το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (Standard Error of the Mean – SEM), τα όρια εμπιστοσύνης του 95% ( 95% Confidence Intervals – 95% CIs) διαφόρων συνεχών μεταβλητών, όπως η ηλικία, η διάρκεια του σακχαρώδους διαβήτη, η ηλικία διάγνωσης του σακχαρώδους διαβήτη, ο BMI, η HbA<sub>1c</sub>, η γλυκόζη νηστείας, η ολική χοληστερόλη, η ΣΑΠ και η ΔΑΠ κ.α.

2) Ελέγχθηκε κατά πόσο ήταν στατιστικώς σημαντική η διαφορά της συχνότητας του πολυμορφισμού

μεταξύ των διαβητικών ασθενών και της ομάδας ελέγχου. Ο έλεγχος αυτός έγινε με την εφαρμογή του κριτηρίου  $\chi^2$ .

3) Για τη σύγκριση συνεχών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Mann-Whitney U test<sup>61</sup>, ενώ για τη σύγκριση των μη συνεχών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο  $\chi^2$  της ανεξαρτησίας. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χωρίς, αλλά και με διόρθωση, των τιμών με βάση το φύλο, την ηλικία και τον BMI.

Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το  $p < 0,05$ .

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των προγραμμάτων Microsoft<sup>®</sup> Excel 2002 και SPSS 11.0 for Windows<sup>®</sup>.

### Αποτελέσματα

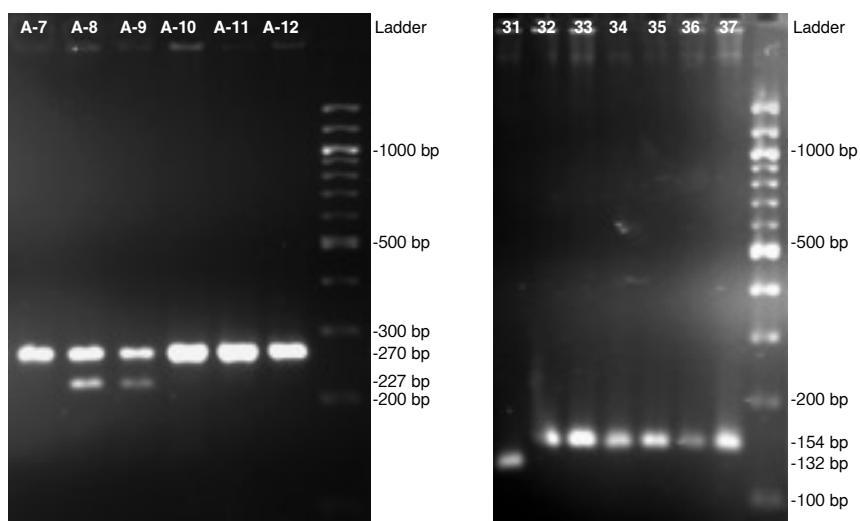
#### Αποτελέσματα ανάλυσης DNA

Συνολικά ανακαλύφθηκαν 9 άτομα που είχαν τον πολυμορφισμό Pro12Ala (1 ομόζυγο Ala/Ala και 8 ετεροζυγα Pro/Ala). Τρία από αυτά φαίνονται στην εικόνα 2.

#### Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης

Στον πίνακα 4 εμφανίζεται η γενοτυπική σύσταση των δύο πληθυσμών ως προς την παρουσία του πολυμορφισμού, ενώ στους Πίνακες 5-8 φαίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων.

Η συχνότητα του αλληλόμορφου Ala είναι 10% στην Ομάδα Ελέγχου (Πίν. 5). Η συχνότητα του αλληλόμορφου Ala στους διαβητικούς ασθενείς είναι 3,5% (Πίν. 5).



Εικ. 2. Αριστερά: Πρωτόκολλο A – Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2,5%.

**Πίνακας 4.** Η γενοτυπική σύσταση των δύο πληθυσμών

Πληθυσμός	N		Γενοτύπος					
			Pro/Pro		Ala/Pro		Ala/Ala	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Ομάδα ελέγχου	25	(100)	21	(84)	3	(12)	1	(4)
Διαβητικοί	72	(100)	67	(93)	5	(7)	0	(0)

Εικονίζονται τα ετερόζυγα Ala/Pro άτομα A-8 και A-9 (εμφανίζουν και τις δύο ζώνες των 270 και των 227 bp) και τα ομόζυγα Pro/Pro άτομα A-7, A-10, A-11 και A-12 (εμφανίζουν μόνο τη ζώνη των 270 bp). Η ζώνη των 43 bp που θα έπρεπε να εμφανίζεται στα ετερόζυγα άτομα βρίσκεται εκτός φωτογραφίας.

Δεξιά: Πρωτόκολλο B – Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 2,5%:

Εικονίζεται το μοναδικό ομόζυγο για τον πολυμορφισμό (Ala/Ala) άτομο. Πρόκειται για το άτομο 31, το οποίο εμφανίζει μόνο τη ζώνη των 132 bp. Εικονίζονται, επίσης, τα ομόζυγα Pro/Pro άτομα 32, 33, 34, 35, 36 και 37 (εμφανίζουν μόνο τη ζώνη των 154 bp). Η ζώνη των 22 bp που θα έπρεπε να εμφανίζεται στο ομόζυγο για τον πολυμορφισμό άτομο 31 βρίσκεται εκτός φωτογραφίας.

Εφαρμόζοντας το κριτήριο  $\chi^2$ , διαπιστώνουμε ότι η συχνότητα του πολυμορφισμού διαφέρει στους δύο πληθυσμούς που μελετήθηκαν σε στατιστικώς σημαντικό επίπεδο ( $p=0,009$ ) (Πίν. 5).

Όσον αφορά την ομάδα των διαβητικών ασθενών, και ως προς ποιοτικά χαρακτηριστικά, αξιοσημείωτη είναι η τάση που παρουσιάζουν τα άτομα

**Πίνακας 5.** Η συχνότητα των αλληλόμορφων

Πληθυσμός	Αλληλόμορφο				p
	Pro		Ala		
	n	Συχνότητα	n	Συχνότητα	
Ομάδα ελέγχου	45	(0,9)	5	(0,1)	0,009*
Διαβητικοί	139	(0,965)	5	(0,035)	

\* Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών

τομα που φέρουν τον πολυμορφισμό να εμφανίζουν σπανιότερα υπερχοληστερόλαια (20% έναντι 70,3%) και συχνότερα αμφιβληστροειδοπάθεια (40% έναντι 11,8%), ενώ επιπλέον έχουν συχνότερα διαβητικούς συγγενείς μέχρι τετάρτου βαθμού (80% έναντι 51,6%) (Πίν. 6). Λόγω του μικρού μεγέθους του πληθυσμού που μελετήθηκε, δεν κατέστη δυνατόν να ελεγχθούν ως προς τη στατιστική τους σημαντικότητα οι διαφορές στα ποιοτικά χαρακτηριστικά, επειδή δεν πληρούνταν οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή της δοκιμασίας  $\chi^2$  της ανεξαρτησίας.

Όσον αφορά τα ποσοτικά χαρακτηριστικά, οι διαβητικοί ασθενείς που φέρουν τον πολυμορφισμό έχουν υψηλότερο βάρος ( $p=0,006$ ) και BMI ( $p=0,027$ ), χαμηλότερη γλυκόζη νηστείας ορού ( $p=0,043$ ) και υψηλότερη συστολική αρτηριακή πίεση ( $p=0,009$ ) από αυτούς που δεν τον φέρουν. Η τάση των διαβητικών με τον πολυμορφισμό να εμφανίζουν υψηλότερη διαστολική αρτηριακή πίεση παραμένει οριακά εκτός στατιστικής σημαντι-

**Πίνακας 6.** Σύγκριση των κλινικών χαρακτηριστικών στις δύο ομάδες ατόμων (με και χωρίς τον πολυμορφισμό) των διαβητικών ασθενών

Χαρακτηριστικό	Πολυμορφισμός			
	N	Pro/Pro Αναλογία (%)	N	Ala/Ala ή Ala/Pro Αναλογία (%)
Φύλο (♂ / ♀)	67	28/39 (41,8/58,2)	5	2/3 (40/60)
Αγωγή (Δίαιτα/Δισκία/Ινσουλίνη)	63	1/59/3 (1,6/93,7/4,8)	5	1/4/0 (20/80/0)
Συγγενείς διαβητικοί*	64	33 (51,6)	5	4 (80)
A/Y*	64	46 (71,9)	5	3 (60)
Υπερχοληστερόλαια*	64	45 (70,3)	5	1 (20)
Επιπλοκές νόσου	64	26 (40,6)	5	3 (60)
Σ/N*	64	18 (28,1)	5	2 (40)
ΑΕΕ *	64	5 (7,8)	5	1 (20)
Αμφιβληστροειδοπάθεια *	34	4 (11,8)	5	2 (40)
Αγγειοπάθεια *	64	4 (6,3)	5	0 (0)
Νευροπάθεια *	64	5 (7,8)	5	0 (0)
Νεφροπάθεια *	64	1 (1,6)	5	0 (0)

\* = Παρουσία

**Πίνακας 7.** Σύγκριση των δύο ομάδων ατόμων (με και χωρίς τον πολυμορφισμό) των διαβητικών ασθενών με τη χρήση του Mann-Whitney U test

Χαρακτηριστικό	N	Pro/Pro		Ala/Ala ή Ala/Pro			P	
		Μέσος όρος	SEM	N	Μέσος όρος	SEM	Asymp. (2-tailed)	Exact [2*(1-tailed)]
Ηλικία (έτη)	63	68,84	0,77	5	69,80	1,53	0,778	0,785
Διάρκεια Σ/Δ (έτη)	57	10,63	0,89	5	7,80	3,02	0,221	0,232
Ηλικία έναρξης Σ/Δ (έτη)	55	58,18	1,05	5	62,00	2,63	0,223	0,237
Ύψος (cm)	63	166,17	1,01	5	165,60	4,86	0,906	0,909
Βάρος (kg)*	63	76,38	1,34	5	88,56	2,87	0,009*	0,006*
BMI (m/kg <sup>2</sup> )*	63	27,74	0,510	5	32,58	2,003	0,030*	0,027*
Περιφέρεια μέσης (cm)	7	108,71	2,101	2	116,75	7,250	0,240	0,333
Περιφέρεια γλουτών (cm)	7	108,71	1,92	2	118,50	6,50	0,184	0,222
Περ. μέσης/Περ. γλουτών	7	1,00	0,018	2	0,98	0,007	0,378	0,500
HbA <sub>1c</sub> (%)	57	9,48	0,198	3	7,90	0,985	0,135	0,143
Γλυκόζη (mg/dl)*	63	211,71	7,23	5	164,80	11,30	0,045*	0,043*
Χοληστερόλη (mg/dl)	62	207,42	4,49	5	194,00	11,03	0,404	0,422
ΣΑΠ (mmHg)*	60	142,17	2,41	5	166,00	6,78	0,011*	0,009*
ΔΑΠ (mmHg)	60	81,58	1,30	5	90,00	3,16	0,060	0,070

\* Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων

**Πίνακας 8.** Οι τιμές P από τη δοκιμασία Mann-Whitney U test μετά τη διόρθωση για φύλο, ηλικία και BMI στις δύο ομάδες ατόμων (με και χωρίς τον πολυμορφισμό) των διαβητικών ασθενών

Χαρακτηριστικό	Φύλο		Ηλικία		BMI	
	Asymp. (2-tailed)	Exact [2*(1-tailed)]	Asymp. (2-tailed)	Exact [2*(1-tailed)]	Asymp. (2-tailed)	Exact [2*(1-tailed)]
Βάρος	0,006*	0,003*	0,015*	0,012*	–	–
BMI	0,028*	0,026*	0,025*	0,022*	–	–
Περιφέρεια γλουτών	0,040*	0,056	0,064	0,133	0,699	0,857
Γλυκόζη	0,054	0,052	0,049*	0,047*	0,226	0,239
ΣΑΠ	0,010*	0,008*	0,035*	0,033*	0,040*	0,037*
ΔΑΠ	0,026*	0,024*	0,117	0,124	0,078	0,078

\* Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ατόμων (με και χωρίς τον πολυμορφισμό)

κότητας ( $p=0,070$ ), ενώ η τάση τους να εμφανίζουν διαβήτη σε μεγαλύτερη ηλικία και χαμηλότερα επίπεδα HbA<sub>1c</sub> και ολικής χοληστερόλης δεν προσεγγίζει στατιστικώς σημαντικό επίπεδο (Πίν. 7). Η συσχέτιση με τη γλυκόζη νηστείας χάνεται μετά τη διόρθωση για τον BMI (Πίν. 8).

### Συζήτηση – Συμπεράσματα

Αναλύοντας τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων από τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν, εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1) Η συχνότητα του αλληλόμορφου Ala είναι 10% στην Ομάδα ελέγχου. Πρόκειται για μια από τις μικρότερες συχνότητες που έχουν παρατηρηθεί

σε Ευρωπαϊκό πληθυσμό<sup>13,15,17,22-26,28,29,31,34,36, 38,39, 41,44,54</sup>. Η μοναδική μελέτη που αναφέρεται σε Έλληνες (άνδρες 18-28 ετών, που επιλέχθηκαν με κριτήριο την παρουσία οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου στον πατέρα τους σε ηλικία < 55 ετών) έδινε συχνότητα 7% γενικώς στο Μεσογειακό χώρο<sup>13</sup>. Η συχνότητα του αλληλόμορφου Ala στους Διαβητικούς ασθενείς είναι 3,5%. Τόσο μικρή συχνότητα του αλληλόμορφου Ala δεν έχει περιγραφεί στο παρελθόν σε Κανκασίους, είτε σε διαβητικούς είτε στο γενικό πληθυσμό. Η μικρότερη συχνότητα που είχε αναφερθεί είναι το 7%<sup>13</sup>.

2) Η συχνότητα του πολυμορφισμού είναι μικρότερη στους διαβητικούς ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, σε επίπεδο στατιστικώς ση-



μαντικό ( $p=0,009$ ). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες, οι οποίες διαπίστωσαν την προστατευτική δράση του πολυμορφισμού όσον αφορά στην εμφάνιση T2DM<sup>12,14,17,23,45,46</sup>.

3) Το γεγονός ότι η συχνότητα του πολυμορφισμού είναι μικρότερη στους διαβητικούς υποδηλώνει ότι η παρουσία του αποτελεί παράγοντα που μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης T2DM, όπως έχει παρατηρηθεί σε παλαιότερες μελέτες. Προκειμένου να εξαχθούν με ασφάλεια παρόμοια συμπεράσματα και για τον Ελληνικό πληθυσμό είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν ευρύτερες μελέτες.

4) Στους διαβητικούς ασθενείς διαπιστώνεται στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφισμού με αυξημένο βάρος και BMI, μειωμένη γλυκόζη ορού νηστείας και αυξημένη ΣΑΠ, ενώ η συσχέτιση με αυξημένη ΔΑΠ πλησιάζει, αλλά δεν φτάνει τη στατιστική σημαντικότητα. Τα συμπεράσματα αυτά ταυτίζονται με την πλειοψηφία των παλαιότερων μελετών που μπόρεσαν να διαπιστώσουν τέτοιου είδους συσχετίσεις. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι όσες εργασίες διαπιστώνουν συσχέτιση του πολυμορφισμού με τη γλυκόζη νηστείας ή με την αρτηριακή πίεση, η συσχέτιση είναι πάντοτε με μείωση της γλυκόζης<sup>14,16,52</sup> και αύξηση της αρτηριακής πίεσης<sup>16,17</sup>. Μόνο όσον αφορά τον BMI υπάρχουν αντιφατικά αποτελέσματα<sup>11,16,18-22,45,53,62</sup>.

5) Όταν εφαρμοστεί η διόρθωση με τον BMI, χάνεται τελείως η συσχέτιση με τη γλυκόζη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η κύρια επίδραση του πολυμορφισμού είναι στον BMI. Το γεγονός αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλες εργασίες<sup>45</sup>. Η συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφισμού με αυξημένο BMI στους διαβητικούς θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως εξής: Ο πολυμορφισμός προστατεύει από την εκδήλωση του T2DM. Επομένως, για να εμφανιστεί T2DM σε άτομο που φέρει τον πολυμορφισμό, πρέπει να «εξουδετερωθεί» αυτή η θετική του δράση. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί με την παρουσία στο άτομο αυτό άλλων παραγόντων κινδύνου που προδιαθέτουν στην εμφάνιση T2DM. Ο αυξημένος BMI αποτελεί αποδεδειγμένο παράγοντα κινδύνου<sup>63</sup>. Μάλιστα οι διαβητικοί που φέρουν τον πολυμορφισμό εμφανίζουν T2DM σε μεγαλύτερη ηλικία από αυτούς που δεν τον φέρουν. Βεβαίως, η συσχέτιση αυτή μένει μακριά από το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας, αποτελεί όμως ακόμη μία ένδειξη που υποστηρίζει την παραπάνω υπόθεση, καθώς η ηλικία αποτελεί

και αυτή επιβαρυντικό παράγοντα για την εκδήλωση του T2DM<sup>63</sup> (η αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη αυξάνει με την ηλικία).

**Επιγραμματικά**, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ο πολυμορφισμός Pro12Ala:

1) Απαντάται σπανιότερα στους ασθενείς με T2DM σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στον Ελληνικό πληθυσμό.

2) Συσχετίζεται στους διαβητικούς ασθενείς με:

α) αυξημένο BMI.

β) μειωμένα επίπεδα γλυκόζης ορού νηστείας.

γ) αυξημένη συστολική αρτηριακή πίεση.

Τέλος, οι διαβητικοί που φέρουν τον πολυμορφισμό εμφανίζουν ισχυρή τάση:

1) να εκδηλώνουν σακχαρώδη διαβήτη σε μεγαλύτερη ηλικία.

2) να έχουν υψηλότερη διαστολική αρτηριακή πίεση.

## Abstract

**Tychalas A, Kouvatsi A, Satsoglou A, Soulis K, Tsochatzis I, Triantafyllidis K. Association of the PPAR $\gamma$  gene polymorphism Pro12Ala with type 2 diabetes mellitus in the population of Central Macedonia. Hellen Diabetol Chron 2004; 1: 48 - 59.**

The nuclear receptor PPAR $\gamma$  is implicated in the mechanisms of adipocyte differentiation as well as in glucose and lipid metabolism. A common polymorphism in the gene encoding PPAR $\gamma$  which is known as Pro12Ala has been associated with decreased risk for type 2 diabetes mellitus, as well as with various effects in weight, insulin resistance and blood pressure and many other clinical and biochemical traits. Thiazolidinediones are PPAR $\gamma$  agonists with antidiabetic actions. PPAR $\gamma$  activation by thiazolidinediones is reduced when Ala variant is present. Two groups of patients with type 2 diabetes mellitus coming from the Prefecture of Kilkis in Northern Greece were analyzed in order to study the Pro12Ala polymorphism in the Greek population. Patients from the first group were treated with a thiazolidinedione while second group consisted of persons whose parents originated from certain geographical areas (East Romylia and East Thrace). Compared to the control group the frequency of Ala variant was found lower in the group of diabetic patients (3,5% versus 10%,  $p<0,01$ ) as well as in that of diabetic patients treated with a thiazolidinedione (1,9% versus 10%,  $p<0,01$ ). Among diabetic persons, Ala variant was associated with higher body mass index ( $p<0,05$ ), lower fasting serum glucose levels ( $p=0,05$ ) and higher systolic

blood pressure ( $p < 0,01$ ). In the group of diabetic persons treated with a thiazolidinedione, Ala variant was associated with later onset of diabetes, if adjustment for sex was taken into account ( $p < 0,05$ ). The results obtained suggest that the Pro12Ala polymorphism protects against type 2 diabetes mellitus in the Greek population and affects some clinical traits in diabetic persons.

### Βιβλιογραφία

1. Zimmet PZ. Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care. *Diabetologia* 1999; 42: 499-518.
2. Reaven GM. Hypothesis: muscle insulin resistance is the ("not-so") thrifty genotype. *Diabetologia* 1998; 41: 482-4.
3. Auwerx J. PPAR $\gamma$ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 1999; 42: 1033-49.
4. Debril MB, Renaud JP, Fajas L, Auwerx J. The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor. *J Mol Med* 2001; 79: 30-47.
5. Issemann I, Green S. Activation of a number of the steroid receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347: 645-50.
6. Sundvold H, Lien S. Identification of a novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)  $\gamma$  promoter in man and transactivation by the nuclear receptor ROR $\alpha$ 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 287: 383-90.
7. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorrbok C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Differential activity of PPAR $\gamma$ 1 and -2 isoforms and influence of insulin. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(32): 20230-5.
8. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yamall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR. Molecular scanning of the human Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  (hPPAR $\gamma$ ) gene in diabetic Caucasians: Identification of a Pro12Ala PPAR $\gamma$ 2 missense mutation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 241: 270-4.
9. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPAR $\gamma$ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Genetics* 1998; 20: 284-7.
10. Hegele RA, Cao H, Harris SB, Hanley AJG, Zinman B, Hanley AJG, Anderson CM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g2 P12A and type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85: 2014-9.
11. Ek J, Urhammer SA, Sorensen TIA, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O (1999) Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor- $\gamma$ 2 (PPAR- $\gamma$ 2): Divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 42: 892-895.
12. Hara K, Okada T, Tobe K, Yasuda K, Mori Y, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Kimura S, Ito C, Kadowaki T. The Pro12Ala polymorphism in PPAR $\gamma$ 2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 271: 212-6.
13. Poirier O, Nicaud V, Cambien F, Tiret L. The Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene is not associated with postprandial responses to glucose or fat tolerance tests in young healthy subjects: the European Atherosclerosis Research Study II. *J Mol Med* 2000; 78: 346-51.
14. Li WD, Lee JH, Price RA. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor g2 Pro12Ala mutation is associated with early onset extreme obesity and reduced fasting glucose. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000; 70: 159-61.
15. Eriksson JG, Lindi V, Uusitupa M, Forsén TJ, Laakso M, Osmond C, Barker JPD. The Effects of the Pro12Ala Polymorphism of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ 2 Gene on Insulin Sensitivity and Insulin Metabolism Interact With Size at Birth. *Diabetes* 2002; 51: 2321-4.
16. Hasstedt SJ, Ren QF, Teng K, Elbein SC. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 pro (12)ala variant on obesity, glucose homeostasis, and blood pressure in members of familial type 2 diabetic kindreds. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86: 536-41.
17. Douglas JA, Erdos MR, Watanabe RM, Braun A, Johnston CL, Oeth P, Mohlke KL, Valle TT, Ehnholm C, Buchanan TA, Bergman RN, Collins FS, Boehnke M and Tuomilehto J. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g2 Pro12Ala variant association with type 2 diabetes and trait differences. *Diabetes* 2001; 50: 886-90.
18. Pihlajamaki J, Miettinen R, Valve R, Karjalainen L, Mykkanen L, Kuusisto J, Deeb S, Auwerx J, Laakso M. The Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator activated receptor gamma 2 is associated with an insulin-sensitive phenotype in families with familial combined hyperlipidemia and in nondiabetic elderly subjects with dyslipidemia. *Atherosclerosis* 2000; 151: 567-74.
19. Lei HH, Chen MH, Yang WS, Chiu MC, Chen MC, Tai TY, Chuang LM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 Pro12Ala gene variant is strongly associated with larger body mass in the Taiwanese. *Metabolism* 2000; 49: 1267-70.
20. Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, Andres R, Roth J, Shuldiner AR. Association of the Pro12Ala variant in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- 2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 1998; 47: 1806-8.
21. Cole SA, Mitchell BD, Hsueh WC, Pineda P, Beamer BA, Shuldiner AR, Comuzzie AG, Blangero J, Hixson JE. The Pro12Ala variant of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2) is associated with measures of obesity in Mexican Americans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 522-4.
22. Valve R, Sivenius K, Miettinen R, Pihlajamaki J, Rissanen A, Deeb SS, Auwerx J, Uusitupa M, Laakso M. Two

- polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 3708-12.
23. *Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES.* The common PPAR $\gamma$  Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 2000; 26: 76-80.
  24. *Evans D, de Heer J, Hagemann C, Wendt D, Wolf A, Beisiegel U, Mann WA.* Association between the P12A and c1431t polymorphisms in the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR gamma) gene and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109: 151-4.
  25. *Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Hansen L, Carstensen B, Borch-Johnsen K, Drivsholm T, Berglund L, Hansen T, Lithell H, Pedersen O.* Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant caucasians. *Diabetologia* 2001; 44: 1170-6.
  26. *Stumvoll M, Stefan N, Fritsche A, Madaus A, Tschrirter O, Koch M, Machicao F, Haring H.* Interaction effect between common polymorphisms in PPARgamma2 (Pro12Ala) and insulin receptor substrate 1 (Gly 972 Arg) on insulin sensitivity. *J Mol Med* 2002; 80: 33-8.
  27. *Nicklas BJ, van Rossum EF, Berman DM, Ryan AS, Dennis KE, Shuldiner AR.* Genetic variation in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene (Pro12Ala) affects metabolic responses to weight loss and subsequent weight regain. *Diabetes* 2001; 50: 2172-6.
  28. *Schneider J, Kreuzer J, Hamann A, Nawroth PP, Dugi KA* The proline 12 alanine substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with lower lipoprotein lipase activity in vivo. *Diabetes* 2002; 51: 867-70.
  29. *Zietz B, Barth N, Spiegel D, Schmitz G, Scholmerich J, Schaffler A.* Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR gamma2) is associated with higher levels of total cholesterol and LDL-cholesterol in male caucasian type 2 diabetes patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2002; 110: 60-6.
  30. *Iwata E, Matsuda H, Fukuda T, Fukuen S, Motomura T, Igarashi T, Yamamoto I, Azuma J.* Mutations of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) gene in a Japanese population: the Pro12Ala mutation in PPAR gamma 2 is associated with lower concentrations of serum total and non-HDL cholesterol. *Diabetologia* 2001; 44: 1354-5.
  31. *Herrmann SM, Ringel J, Wang JG, Staessen JA, Brand E; The Berlin Diabetes Mellitus (BeDiaM) Study.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 polymorphism Pro12Ala is associated with nephropathy in type 2 diabetes: The Berlin Diabetes Mellitus (Be DiaM) Study. *Diabetes* 2002; 51: 2653-7.
  32. *Smith WM, Zhou XP, Kurose K, Gao X, Latif F, Kroll T, Sugano K, Cannistra SA, Clinton SK, Maher ER, Prior TW, Eng C.* Opposite association of two PPAR $\gamma$  variants with cancer: overrepresentation of H449H in endometrial carcinoma cases and underrepresentation of P12A in renal cell carcinoma cases. *Hum Genet* 2001; 109: 146-51.
  33. *Zhou XP, Smith WM, Gimm O, Mueller E, Gao X, Sarraf P, Prior TW, Plass C, von Deimling A, Black PM, Yates AJ, Eng C.* Over-representation of PPARgamma sequence variants in sporadic cases of glioblastoma multiforme: preliminary evidence for common low penetrance modifiers for brain tumour risk in the general population. *J Med Genet* 2000; 37: 410-4.
  34. *Ringel J, Engeli S, Distler A, Sharma AM.* Pro12Ala missense mutation of the peroxisome proliferator activated receptor gamma and diabetes mellitus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 254: 450-3.
  35. *Schaffler A, Barth N, Schmitz G, Zietz B, Palitzsch KD, Scholmerich J.* Frequency and significance of Pro12Ala and Pro115Gln polymorphism in gene for peroxisome proliferation-activated receptor-gamma regarding metabolic parameters in a Caucasian cohort. *Endocrine* 2001; 14: 369-73.
  36. *Hamann A, Munzberg H, Buttron P, Busing B, Hinney A, Mayer H, Siegfried W, Hebebrand J, Greten H.* Missense variants in the human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene in lean and obese subjects. *European Journal of Endocrinology* 1999; 141: 90-2.
  37. *Mori Y, Kim-Motoyama H, Katakura T, Yasuda K, Kadowaki H, Beamer BA, Shuldiner AR, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T.* Effect of the Pro12Ala variant of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor g2 gene on adiposity, fat distribution, and insulin sensitivity in Japanese men. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 251: 195-8.
  38. *Clement K, Hercberg S, Passinge B, Galan P, Varroud-Vial M, Shuldiner AR, Beamer BA, Charpentier G, Guy-Grand B, Froguel P, Vaisse C.* The Pro115Gln and Pro12Ala PPAR gamma gene mutations in obesity and type 2 diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 391-3.
  39. *Mancini FP, Vaccaro O, Sabatino L, Tufano A, Rivellese AA, Riccardi G, Colantuoni V.* Pro12Ala substitution in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g2 is not associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48:1466-8.
  40. *Oh EY, Min KM, Chung JH, Min YK, Lee MS, Kim KW, Lee MK* Significance of Pro12Ala mutation in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ 2 in Korean diabetic and obese subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; 85: 1801-4.
  41. *Laasanen J, Heinonen S, Hiltunen M, Mannermaa A, Laakso M.* Polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in women with preeclampsia. *Early Hum Dev* 2002; 69: 77-82.
  42. *Nemoto M, Sasaki T, Deeb SS, Fujimoto WY, Tajima N.* Differential effect of PPAR $\gamma$ 2 variants in the development of type 2 diabetes between native Japanese and Japanese Americans. *Diabetes Research and Clinical*

- Practice 2002; 57: 131-7.
43. Fu M, Chen H, Li X, Li J, Wu B, Cheng L, Cai M, Fu Z. Association of Pro12Ala variant in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with type 2 diabetes mellitus. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2002; 19: 234-8.
  44. Yanagisawa Y, Hasegawa K, Dever GJ, Otto CTO, Sakuma M, Shibata S, Miyagi S, Kaneko Y, Kagawa Y. Uncoupling Protein 3 and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor g2 contribute to obesity and diabetes in Palauans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 281: 772-8.
  45. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Genetics* 1998; 20: 284-7.
  46. Mori H, Ikegami H, Kawaguchi H, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E and Kasuga M. The Pro12Ala substitution in PPAR-g is associated with resistance to development of diabetes in the general population: Possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; 50: 891-4.
  47. Koch M, Rett K, Maerker E, Volk A, Haist K, Deninger M, Renn W, Haring HU. (1999) The PPARg2 amino acid polymorphism Pro 12 Ala is prevalent in offspring of type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. *Diabetologia* 1999; 42: 758-62.
  48. Ristow M, Muller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *New England Journal of Medicine* 1998; 339: 953-9.
  49. Hara K, Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Miki H, Komeda K, Tamemoto H, Yamauchi T, Hagura R, Ito C, Akanuma Y, Kadowaki T. The role of PPARgamma as a thrifty gene both in mice and humans. *Br J Nutr* 84 Suppl 2000; 2: S235-9.
  50. Jacob S, Stumvoll M, Becker R, Koch M, Nielsen M, Loblein K, Maerker E, Volk A, Renn W, Balletshofer B, Machicao F, Rett K, Haring HU. The PPARgamma2 polymorphism pro12Ala is associated with better insulin sensitivity in the offspring of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* 2000; 32: 413-6.
  51. Stumvoll M, Wahl HG, Loblein K, Becker R, Machicao F, Jacob S, and Haring H. Pro12Ala Polymorphism in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g2 Gene Is Associated With Increased Antilipolytic Insulin Sensitivity. *Diabetes* 2001; 50: 876-81.
  52. Ahluwalia M, Evans M, Morris K, Currie C, Davies S, Rees A, Thomas A. (2002) The influence of the Pro12Ala mutation of the PPAR-gamma receptor gene on metabolic and clinical characteristics in treatment-naive patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2002; 4: 376-8.
  53. Hsueh WC, Cole SA, Shuldiner AR, Beamer BA, Blangero J, Hixson JE, MacCluer JW, Mitchell BD. Interactions between variants in the beta3-adrenergic receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 genes and obesity. *Diabetes Care* 2001; 24: 672-27.
  54. Vaccaro O, Mancini FP, Ruffa G, Sabatino L, Colantuoni V, Riccardi G. Pro12Ala mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPARgamma2) and severe obesity: a case-control study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 1195-9.
  55. Stumvoll M, Haring H. Reduced lipolysis as possible cause for greater weight gain in subjects with the Pro12Ala polymorphism in PPARγ2? *Diabetologia* 2002; 45: 152-3.
  56. Swarbrick MM, Chapman CM, McQuillan BM, Hung J, Thompson PL, Beilby JP. A Pro12Ala polymorphism in the human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. *European Journal of Endocrinology* 2001; 144: 277-82.
  57. Thamer C, Haap M, Volk A, Maerker E, Becker R, Bachmann O, Machicao F, Haring HU, Stumvoll M. Evidence for greater oxidative substrate flexibility in male carriers of the Pro12Ala polymorphism in PPARgamma2. *Horm Metab Res* 2002; 34: 132-6.
  58. Evans D, Mann WA, Heer J, Michel U, Wendt D, Kortner B, Wolf A, Beisiegel U. Variation in the gene for human peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) does not play a major role in the development of morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 647-51.
  59. Stumvoll M, Haring H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* 2002; 51: 2341-7.
  60. Alberti KG, 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.
  61. Τσάντας Ν, Μουσιάδης Χ, Παργιάτης Ν, Χατζηπαντελής Θ. Ανάλυση δεδομένων με τη βοήθεια στατιστικών πακέτων: SPSS 7.5, Excel '97, S-Plus 3.3. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, 1999.
  62. Kawasaki I, Tahara H, Emoto M, Shoji T, Shioji A, Okuno Y, Inaba M, Nishizawa Y. Impact of Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma2 on obesity and insulin resistance in Japanese Type 2 diabetic and healthy subjects. *Osaka City Med J* 2002; 48: 23-8.
  63. Choi BCK, Shi F. Risk factors for diabetes mellitus by age and sex: results of the National Population Health Survey. *Diabetologia* 2001; 44: 1221-31.

#### Λέξεις κλειδιά:

Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2  
Γονίδια PPARγ

#### Key words:

Type 2 diabetes mellitus  
Genes PPARγ