



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ,
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**Παπαϊωάννου Όλγα
Βιολόγος**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Φαρμακογενετική μελέτη του γονιδίου *TCF7L2* και
της ανταπόκρισης στη θεραπεία με ανάλογα του
παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτίδιου-1 (GLP-1) σε
ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 στον
ελληνικό πληθυσμό**

Λάρισα 2016

Φαρμακογενετική μελέτη του γονιδίου *TCF7L2* και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με ανάλογα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1) σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 στον ελληνικό πληθυσμό

Pharmacogenetic study of *TCF7L2* gene and response to treatment with glucagon-like peptide (GLP-1) receptor agonists in Type II diabetes mellitus patients in the Greek population

Μέλη τριμελούς επιτροπής

Σαραφίδου Θεολογία (επιβλέπουσα)

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κώτσα Καλλιόπη

Επίκουρος Καθηγήτρια Ενδοκρινολογίας-Διαβητολογίας, Τμήμα Ενδοκρινολογίας,
Διαβήτη και Μεταβολισμού, Α' Παθολογική Κλινική, Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ, Ιατρική
Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Ευχαριστίες

Η μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Σαραφίδου Θεολογία, που μου εμπιστεύτηκε την εκτέλεση αυτής της εργασίας. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Βασιλόπουλο Ιωάννη για τη συνεχή βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή γενετικής κ. Μαμούρη Ζήση για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτής της έρευνας, καθώς και την κ. Κώτσα Καλλιόπη, για τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το διδάκτορα Σταμάτη Κωνσταντίνο, τους υποψήφιους διδάκτορες Γαλλιοπούλου Ελένη , Γιαννούλη Θεμιστοκλή και Σαρρή Κωνσταντίνα για τη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνεργαστήκαμε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, που έκαναν αυτή την εμπειρία ακόμη πιο όμορφη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
2.1 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II	10
2.1.1 Γενικά για την ασθένεια	10
2.1.2 Αίτια και διάγνωση του Διαβήτη τύπου	11
2.1.3 Παθοφυσιολογία του ΣΔΤ2.....	13
2.1.4 Ο τρόπος ζωής και το γενετικό υπόβαθρο ως παράγοντες εμφάνισης ΣΔΤ2.....	14
2.1.4.1 Ταυτοποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΤ2.....	15
2.2 Οι ινκρετίνες GLP-1, GIP και ο ρόλος τους στο ΣΔΤ2.....	21
2.2.1 Το φαινόμενο της ινκρετίνης.....	21
2.2.2 Οι ινκρετίνες GIP και GLP-1 και οι υποδοχείς τους.....	21
2.2.3 Οι φυσιολογικές δράσεις των GIP και GLP-1 στο πάγκρεας.....	24
2.2.4 Ο ρόλος του GLP-1 και του GLP-1R στην ομοιόσταση της γλυκόζης.....	26
2.2.5 Ινκρετίνες και ανάλογα των ινκρετινών ως θεραπευτικοί παράγοντες στο ΣΔΤ2.....	26
2.2.6 Φάρμακα ανάλογα των ινκρετινών.....	30
2.3 Φαρμακογενετική και σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.....	33
2.3.1 Φαρμακογενετική.....	33
2.3.2 Φαρμακογενετικές μελέτες στο ΣΔΤ2.....	37
2.3.3 Το γονίδιο <i>TCF7L2</i> και ο πολυμορφισμός IVS3 C>T (rs7903146).....	46
Σκοπός εργασίας.....	51
III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	52

3.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από αίμα.....	52
3.1.1. Αρχή της μεθόδου.....	52
3.2 Έλεγχος της απομόνωσης του DNA.....	54
3.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	54
3.2.2 Κατασκευή πηκτώματος αγαρόζης.....	55
3.3 Η τεχνική PCR.....	56
3.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	56
3.3.2 PCR.....	57
3.3.3 Ανίχνευση προϊόντων PCR.....	59
3.4 Γονοτύπηση με RFLP.....	59
3.5 Στατιστική ανάλυση.....	59
VI. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	60
4.1 Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΣΔΤ2	60
4.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος.....	61
4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	62
4.4 Γονοτύπηση.....	63
4.5 Στατιστική ανάλυση.....	65
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	71
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74
Παράρτημα.....	82

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2) είναι μια χρόνια μεταβολική διαταραχή, η επικράτηση της οποίας αυξάνεται σταθερά σε όλο τον κόσμο. Ο ΣΔΤ2 χαρακτηρίζεται από έλλειψη ευαισθησίας στην ινσουλίνη, ως αποτέλεσμα της αντίστασης στην ινσουλίνη, μείωση της παραγωγής ινσουλίνης και προοδευτική ανεπάρκεια των βήτα παγκρεατικών κυττάρων. Η χρόνια υπεργλυκαιμία του διαβήτη συνδέεται με μακροχρόνια βλάβη, δυσλειτουργία και ανεπάρκεια διαφόρων οργάνων, ιδιαίτερα των ματιών, των νεφρών, των νεύρων, της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων. Ο ΣΔΤ2 αποτελεί πολυπαραγοντική νόσο, στην εμφάνιση της οποίας συντελούν πολλοί διαφορετικοί παράγοντες όπως το περιβάλλον και διάφοροι γενετικοί παράγοντες. Ένας γενετικός δείκτης που έχει συσχετιστεί με το ΣΔΤ2 σε αρκετές μελέτες με αξιοσημείωτη επαναληψιμότητα είναι ο πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (SNP) στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *TCF7L2*, ο rs7903146 (C/T) και το αλληλόμορφο κινδύνου έχει ταυτοποιηθεί ως το «Τ». Αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1), όπως τα φάρμακα εξενατίδη, λιραγλουτίδη και λιξιसेνατίδη έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται πλέον ως νέοι θεραπευτικοί παράγοντες στο ΣΔΤ2.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι η διερεύνηση της ανάλυσης συσχέτισης του πολυμορφισμού IVS3 C>T (rs7903146) του γονιδίου *TCF7L2* με την απόκριση στη θεραπεία με αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1).

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ΣΔΤ2 (n=40) του Διαβητολογικού Κέντρου της Α' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ της Θεσσαλονίκης, οι οποίοι έλαβαν θεραπεία με αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1) για 6 μήνες. Η στατιστική ανάλυση του πολυμορφισμού rs7903146 του γονιδίου *TCF7L2* δεν έδειξε σημαντική συσχέτιση (P=0,26) του rs7903146 με την απόκριση στη θεραπεία με όλους τους αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1). Η κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει φαρμάκου έδειξε ότι υπήρχε οριακά σημαντική συσχέτιση (P=0,042) μεταξύ του αλληλομόρφου «Τ» και των μη ανταποκριθέντων ασθενών που έλαβαν θεραπεία με λιραγλουτίδη (n=22), ενώ η ανάλυση για τους ασθενείς που έλαβαν εξενατίδη (n=14) ή λιξιसेνατίδη (n=4) δεν

έδειξε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση, πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων.

Καθώς φαίνεται τάση για συσχέτιση του πολυμορφισμού rs7903146 του γονιδίου *TCF7L2* με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με ανάλογα ινκρετινών, κρίνεται σκόπιμη η συνέχιση της ανάλυσης σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων όσον αφορά τη χρήση αυτού του πολυμορφισμού ως προγνωστικό δείκτη για την απόκριση των ασθενών με ΣΔΤ2 στη θεραπεία με ανάλογα ινκρετινών.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disorder in which prevalence has been increasing steadily all over the world. T2DM is characterized by insulin insensitivity as a result of insulin resistance, declining insulin production, and eventual pancreatic beta-cell failure. Chronic hyperglycemia of T2DM is associated with long-term damage, dysfunction and failure of various organs, especially the eyes, kidneys, nerves, heart and blood vessels. The type 2 diabetes is a multifactorial disease, the appearance of which depends on many different factors such as the environment and various genetic factors. In several studies, the strongest association with T2DM was identified with a single-nucleotide polymorphism (SNP) in intron 4 of gene *TCF7L2*, (rs7903146). This polymorphism is a replacement of cytosine with thymine and the risk allele identified as “T”. Glucagon-like peptide (GLP-1) receptor agonists, such as exenatide, liraglutide and lixisenatide are used as novel therapeutic agents to T2DM.

The aim of this study is to investigate the association analysis between the SNP rs7903146 (IVS3 C>T) of *TCF7L2* gene and the response to treatment with glucagon-like peptide (GLP)-1 receptor agonists.

This analysis was performed on patients with T2DM (n=40) of the Diabetes Center of First Medical Department of the University Hospital AHEPA in Thessaloniki, who received glucagon-like peptide (GLP-1) receptor agonists therapy for 6 months. The statistical analysis of the rs7903146 polymorphism of *TCF7L2* gene, showed no significant association (P=0.26) of the allele “T” in response to treatment with all glucagon-like peptide (GLP-1) receptor agonists. The stratification of patients by type of pharmacological agent showed a marginally significant association (P = 0.042) between the allele “T” and non responder patients who were treated with Liraglutide (n = 22), while the analysis for patients who received exenatide (n = 14) or lixisenatide (n=4), showed no statistically significant association, maybe due to the small number of samples.

In this study a trend for association was observed between the SNP rs7903146 of *TCF7L2* gene and response to treatment with incretin-based therapies. Therefore it should be replicated in a larger cohort of patients in order to firmly evaluate the use of

this polymorphism as a predictor for response to treatment with incretin analogues in patients with type 2 diabetes.

II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II

2.1.1 Γενικά για την ασθένεια

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι ίσως μία από τις παλαιότερες ασθένειες που γνωρίζει ο άνθρωπος. Η πρώτη αναφορά έγινε σε ένα αιγυπτιακό χειρόγραφο περίπου 3000 χρόνια πριν. Το 1936, πραγματοποιήθηκε η σαφής διάκριση μεταξύ του ΣΔ τύπου 1 και τύπου 2 (Ahmed A.M., 2002). Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2) είναι η συχνότερη μορφή διαβήτη και χαρακτηρίζεται από αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, δηλαδή μειωμένη ικανότητα απόκρισης των κυττάρων στην ινσουλίνη και διαταραχές στην έκκρισή της, δηλαδή ανεπαρκής έκκριση της ορμόνης από τα β κύτταρα του παγκρέατος, όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα. Καθένα από τα δύο αυτά χαρακτηριστικά του ΣΔΤ2 μπορεί να είναι το κυρίαρχο γνώρισμά του και συνήθως είναι και τα δύο παρόντα όταν η ασθένεια είναι κλινικά έκδηλη (Billings L.K. et al., 2010).

Ο ΣΔΤ2 κυμαίνεται από κυρίαρχη ινσουλινοαντίσταση με σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης μέχρι κυρίαρχη διαταραχή στην έκκριση της ινσουλίνης με συνοδό ινσουλινοαντίσταση (Κατσίκη Ν. και συν, 2010). Επίσης, ο ΣΔΤ2, πρώην γνωστός ως μη ινσουλινοεξαρτώμενος ή ινσουλινοανεξάρτητος ΣΔ, είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης γενετικών, περιβαλλοντικών και συμπεριφορικών παραγόντων (Chen L. et al., 2011).

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι μια προοδευτική ασθένεια με βαθμιαία αυξανόμενη επικράτηση (Song X. et al., 2015). Κατά τη διάρκεια των τριών τελευταίων δεκαετιών, ο αριθμός των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη έχει υπερδιπλασιαστεί σε παγκόσμιο επίπεδο, καθιστώντας τον μία από τις πιο σημαντικές προκλήσεις για τη δημόσια υγεία σε όλα τα έθνη. Ο Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2) και ο προδιαβήτης (μια ενδιάμεση κατάσταση της υπεργλυκαιμίας κατά την οποία η γλυκόζη του αίματος είναι υψηλότερη από το φυσιολογικό, αλλά κάτω από το κατώφλι του διαβήτη) παρατηρούνται όλο και περισσότερο σε παιδιά, εφήβους και νεαρούς ενήλικες (Chen L. et al., 2011; Bansal N., 2015). Εκτιμάται ότι το 2011, 366 εκατομμύρια άνθρωποι νόσησαν από ΣΔΤ2 και 4.6 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από αυτόν, ενώ το 2030 το ποσό θα ανέλθει στα 552 εκατομμύρια άτομα. (Olokoba A. B. et al., 2012). Επί του παρόντος, 340 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν

παγκοσμίως από αυτή τη νόσο και εκτιμάται ότι μέχρι το 2030 θα είναι η έβδομη κύρια αιτία θνησιμότητας (Song X. et al., 2015).

Η συχνότητα του ΣΔΤ2 ποικίλλει σημαντικά από τη μια γεωγραφική περιοχή στην άλλη ως αποτέλεσμα των περιβαλλοντικών παραγόντων και του τρόπου ζωής (Olokoba A. B. et al., 2012).

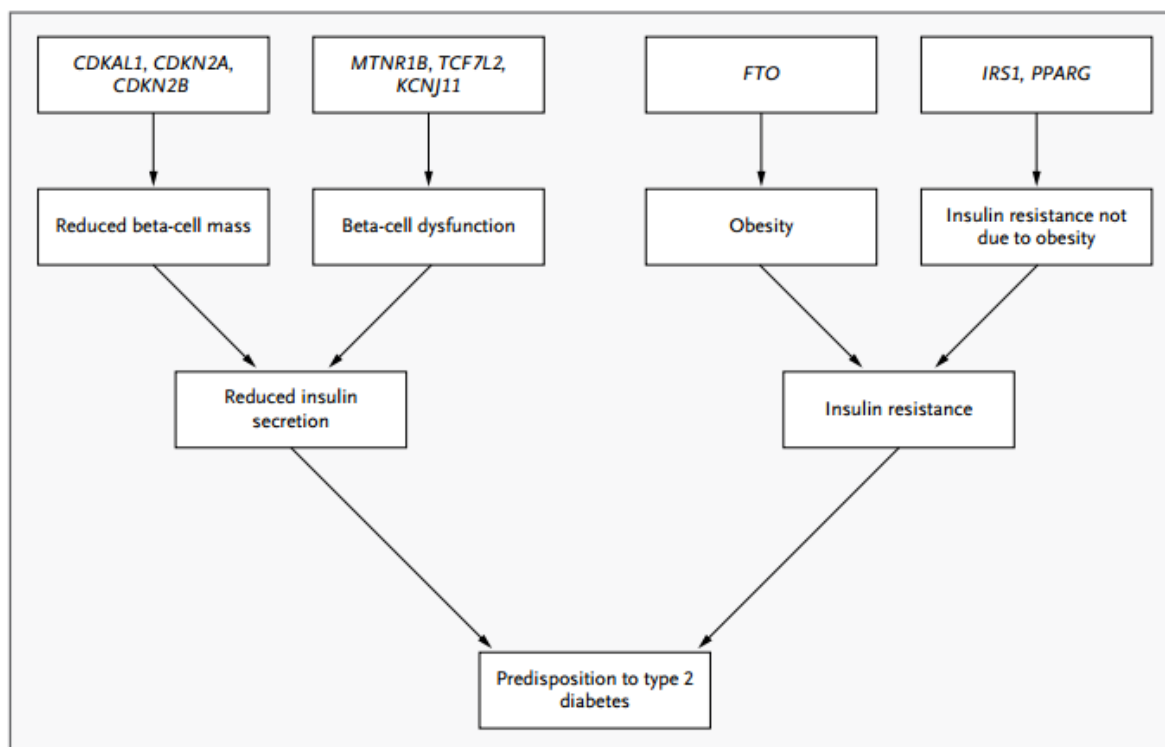
Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι μία κοινή ασθένεια στον ελληνικό πληθυσμό με περίπου 1 στα 5 άτομα να μη γνωρίζουν ότι πάσχουν από αυτή τη νόσο (Panagiotakos D. B. et al., 2005). Επιδημιολογικές μελέτες στον ελληνικό πληθυσμό έχουν δείξει ότι ο επιπολασμός του διαβήτη είναι επίσης σε άνοδο, καθώς αυξήθηκε από 5,7% το 2001 σε 10,4% το 2006 (Avramopoulos I. et al., 2015). Μία πρόσφατη ελληνική μελέτη σε ένα μεγάλο αντιπροσωπευτικό δείγμα αγροτικών, αστικών και προαστιακών πληθυσμών έδειξε ότι ο ΣΔΤ2 σχετίζεται στην Ελλάδα με την προχωρημένη ηλικία, την παχυσαρκία, την έκθεση στον καπνό, και τη χαμηλή κοινωνικοοικονομική κατάσταση (Tentolouris N. et al., 2012; Migdalis I. et al., 2015).

Τέλος, τα αίτια της επιδημίας του ΣΔΤ2 είναι ενσωματωμένα σε μια πολύ περίπλοκη ομάδα γενετικών και επιγενετικών συστημάτων που αλληλεπιδρούν μέσα σε ένα εξίσου πολύπλοκο κοινωνικό πλαίσιο που καθορίζεται από τη συμπεριφορά και τις επιδράσεις του περιβάλλοντος (Chen L. et al., 2011).

2.1.2 Αίτια και διάγνωση του διαβήτη τύπου 2

Ο διαβήτης τύπου 2 είναι μια πολύ ετερογενής διαταραχή και τα αίτιά του ποικίλουν, χωρίς να μπορούν να διευκρινιστούν πλήρως. Ωστόσο, σε αυτόν τον τύπο δε συμβαίνει αυτοάνοση καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων και στους ασθενείς δεν ανευρίσκονται οι αιτιολογικοί παράγοντες των υπόλοιπων τύπων διαβήτη (DeFronzo R. A. et al., 2015). Τα μονοπάτια που εμπλέκονται στη δημιουργία της νόσου απεικονίζονται στην Εικόνα 1. Ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται από υψηλή γενετική προδιάθεση που είναι αρκετά περίπλοκη και δεν είναι σαφώς καθορισμένη ακόμα (Meigs J. B. et al., 2008). Έτσι λοιπόν, ο ΣΔΤ2 είναι

μια ασθένεια που παράγεται από το συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (Kaur T. et al., 2010).



Εικόνα 1: Μονοπάτια που εμπλέκονται στο ΣΔΤ2 (Mc Carthy M.I., 2010).

Η διάγνωση της ασθένειας αυτής καθυστερεί πολλά χρόνια, διότι η υπεργλυκαιμία στα αρχικά στάδια δεν είναι τόσο σοβαρή για να προκαλέσει τα εμφανή συμπτώματα της νόσου. Επίσης, η νόσος αυτή είναι συχνά ασυμπτωματική. Παρόλα αυτά, τέτοιοι ασθενείς βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μακροαγγειακών και μικροαγγειακών επιπλοκών (Κατσίκη Ν. και συν, 2010). Οι άνθρωποι που ζουν με ΣΔΤ2 είναι πιο ευάλωτοι σε διάφορες μορφές βραχυπρόθεσμων όσο και μακροπρόθεσμων επιπλοκών, οι οποίες συχνά οδηγούν στον πρόωρο θάνατό τους. Αυτή η τάση της αυξημένης νοσηρότητας και θνησιμότητας που παρατηρείται στους ασθενείς με ΣΔΤ2, συμβαίνει λόγω του χαρακτήρα αυτού του τύπου διαβήτη, δηλαδή της ύπουλης έναρξης και της αργής αναγνώρισης, ειδικά σε χώρες με μη ανεπτυγμένο σύστημα υγείας όπως η Αφρική (Azevedo M. et al., 2008).

Οι εξετάσεις για τον προσυμπτωματικό έλεγχο και η διάγνωση του ΣΔΤ2 είναι διαθέσιμες. Το τεστ που συνιστάται για τον προσυμπτωματικό έλεγχο της ασθένειας είναι ίδιο με εκείνο που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της, έτσι ώστε

ένα θετικό αποτέλεσμα στον προσυμπτωματικό έλεγχο να είναι ισοδύναμο με τη διάγνωση προ-διαβήτη ή ΣΔ (Cox E.M. et al., 2009).

2.1.3 Παθοφυσιολογία του ΣΔΤ2

Ο ΣΔΤ2 χαρακτηρίζεται από έλλειψη ευαισθησίας στην ινσουλίνη, ως αποτέλεσμα της αντίστασης στην ινσουλίνη, μείωση της παραγωγής ινσουλίνης και προοδευτική ανεπάρκεια των βήτα παγκρεατικών κυττάρων. Αυτό οδηγεί σε μείωση της μεταφοράς της γλυκόζης στο ήπαρ, στα μυϊκά κύτταρα και στα λιποκύτταρα. Έτσι συμβαίνει μια αύξηση στην κατανομή του λίπους με υπεργλυκαιμία. Πρόσφατα έχει αναγνωριστεί η συμμετοχή της διαταραγμένης λειτουργίας των άλφα-κυττάρων στην παθοφυσιολογία του ΣΔΤ2. Δεδομένων των ανεπαρκών επιπέδων της ινσουλίνης και της αυξημένης αντίστασης σε αυτή την ορμόνη δημιουργείται υπεργλυκαιμία (Olokoba A. B. et al., 2012).

Η χρόνια υπεργλυκαιμία του διαβήτη συνδέεται με μακροχρόνια βλάβη, δυσλειτουργία και ανεπάρκεια διαφόρων οργάνων, ιδιαίτερα των ματιών, των νεφρών, των νεύρων, της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων (DeFronzo R. A. et al., 2015). Επιπλέον παθοφυσιολογικές διαταραχές είναι η υπεργλυκαιμία και η αυξημένη ηπατική ευαισθησία στη χορήγηση γλυκαγόνης, η αυξημένη νεφρική επαναρρόφηση γλυκόζης, η μείωση των ινκρετινών (GLP-1 και GIP), η δυσλειτουργία των νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο που οδηγεί σε διαταραχή της όρεξης και η αύξηση του σωματικού βάρους (DeFronzo R. A. et al., 2015).

Τέλος, η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι η πρώτη ανιχνεύσιμη ανωμαλία στο ιστορικό του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Με την προοδευτική ανεπάρκεια β-κυττάρων, παρουσία αυτής της αντίστασης στην ινσουλίνη, πραγματοποιείται η μετάβαση των ατόμων από τη φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη σε εξασθενημένη ανοχή στη γλυκόζη και σε εμφανή διαβήτη τύπου 2 (DeFronzo R. A. et al., 2015).

2.1.4 Ο τρόπος ζωής και το γενετικό υπόβαθρο ως παράγοντες εμφάνισης ΣΔΤ2

Η ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2 καθορίζεται από δύο παράγοντες: γενετικούς και περιβαλλοντικούς. Ένας αριθμός παραγόντων του τρόπου ζωής είναι γνωστό ότι είναι σημαντικοί για την ανάπτυξη του ΣΔΤ2. Αυτοί είναι η έλλειψη σωματικής άσκησης, ο καθιστικός τρόπος ζωής, το κάπνισμα, η μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ και η παχυσαρκία (Hu F.B. et al., 2001). Πιο συγκεκριμένα, η σωματική δραστηριότητα έχει αναφερθεί επανειλημμένα να είναι αντιστρόφως ανάλογη με τον μελλοντικό κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 στους περισσότερους πληθυσμούς. Ανώτατα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας σχετίζονται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη σε οικολογικές μελέτες και σε μελέτες επιπολασμού (Hu F.B. et al., 1999). Η χαμηλή καρδιοαναπνευστική λειτουργία αντιπροσωπεύει ένα μεγαλύτερο παράγοντα κινδύνου από ό, τι η παχυσαρκία για την ανάπτυξη του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Επιπλέον, η άσκηση αυτή καθαυτή μπορεί να βελτιώσει τον έλεγχο της γλυκόζης του αίματος και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, ειδικά αν πραγματοποιείται ένας συνδυασμός αερόβιας άσκησης και αντοχής (Vinetti G. et al., 2015).

Μία σημαντική προδιάθεση για αντίσταση στην ινσουλίνη παρατηρείται με την παχυσαρκία, η οποία έχει χαρακτηριστεί ως δείκτης μάζας σώματος μεγαλύτερο από 30 (Kimple M. E. et al., 2014). Οι περισσότεροι ασθενείς με τον τύπο 2 του διαβήτη είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι και η ίδια η παχυσαρκία προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη. Πολλοί από εκείνους που δεν είναι παχύσαρκοι με βάση τα παραδοσιακά κριτήρια, για παράδειγμα με βάση τον δείκτη μάζας σώματος, μπορεί να έχουν αυξημένο ποσοστό σωματικού λίπους που να διανέμεται κυρίως στην κοιλιακή περιοχή (Κατσίκη Ν. και συν, 2010).

Επιπλέον, η συγκεκριμένη ασθένεια εμφανίζεται πιο συχνά σε γυναίκες με ΣΔ κήσης, σε άτομα με υπέρταση ή δυσλιπιδαιμία και η συχνότητα εμφάνισής του ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων πληθυσμιακών ομάδων (WHO, 1999).

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που υποδηλώνουν σημαντικά επίπεδα κληρονομικότητας στον ΣΔΤ2. Μελέτες σε οικογένειες έχουν αποκαλύψει ότι οι πρώτου βαθμού συγγενείς των ατόμων με διαβήτη τύπου 2 έχουν περίπου 3 φορές

περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν τη νόσο από τα άτομα χωρίς οικογενειακό ιστορικό της ασθένειας (Omar A., 2013). Υπάρχει δηλαδή, μια ισχυρή κληρονομική γενετική σύνδεση στο ΣΔΤ2. Επιπλέον, το 25% των ατόμων που πάσχουν από τη νόσο έχουν οικογενειακό ιστορικό (Olokoba A. B. et al., 2012).

Το γενετικό υπόβαθρο του ΣΔΤ2 είναι αναμφίβολα ετερογενές. Η κληρονομικότητα του ΣΔΤ2 ποικίλει από 20% έως 80%. Αποδείξεις για τη γενετική βάση του ΣΔΤ2 προέρχονται από μελέτες οικογενειών, διδύμων και πληθυσμών (Omar A., 2013). Μελέτες διδύμων εκτιμούν τη γενετική συνιστώσα, συγκρίνοντας την αντιστοιχία της νόσου στα διζυγωτικά δίδυμα σε σχέση με μονοζυγωτικά δίδυμα. Σε αυτές τις μελέτες οι τιμές αντιστοιχίας για μονοζυγωτικά δίδυμα κυμαίνονται μεταξύ 34% και 100% (DeFronzo R. A. et al., 2015). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από μελέτες διδύμων για το ρόλο των γονιδίων δείχνουν υψηλό βαθμό συμφωνίας για το ΣΔΤ2 ανάμεσα στα μονοζυγωτικά δίδυμα (41% έως 55%) σε σύγκριση με τα διζυγωτικά (10% έως 15%) (Malecki M.T et al., 2005). Ο κίνδυνος ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2 είναι 40% για τα άτομα που έχουν ένα γονέα με διαβήτη τύπου 2 και 70% αν και οι δύο γονείς πάσχουν από αυτή τη νόσο (Omar A., 2013).

2.1.4.1 Ταυτοποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΤ2

Προσέγγιση του υποψήφιου γονιδίου

Στις μελέτες υποψηφίων γονιδίων, μελετήθηκαν τα γονίδια για τα οποία υπήρχαν ενδείξεις ότι παίζουν ρόλο στην παθογένεση της ασθένειας, μέσω εστιασμένων προσπαθειών αλληλούχησης. Η συνήθης στρατηγική ήταν να επικεντρωθούν σε γονίδια που ήδη ήταν γνωστό ότι εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στην έκκριση ινσουλίνης, στους υποδοχείς ινσουλίνης, στη σηματοδότηση του υποδοχέα της ινσουλίνης και στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Τα σχετικά λίγα γονίδια που βρέθηκαν να σχετίζονται με τη νόσο περιλαμβάνουν: τον ενεργοποιημένο από τον πολλαπλασιαστή υπεροξειδιοσώματος υποδοχέα γάμμα (*PPARG*), το υπόστρωμα του ινσουλινικού υποδοχέα *IRS1* και *IRS2*, το κανάλι καλίου της υποοικογένειας J (*KCNJ11*), το γονίδιο του συνδρόμου Wolfram 1 (*WFS1*), τα γονίδια *HNF1A*, *HNF1B* και *HNF4A*. Επίσης, τα γονίδια *RAPGEF1* και *TP53* (Omar A., 2013).

Μελέτες γενετικής σύνδεσης

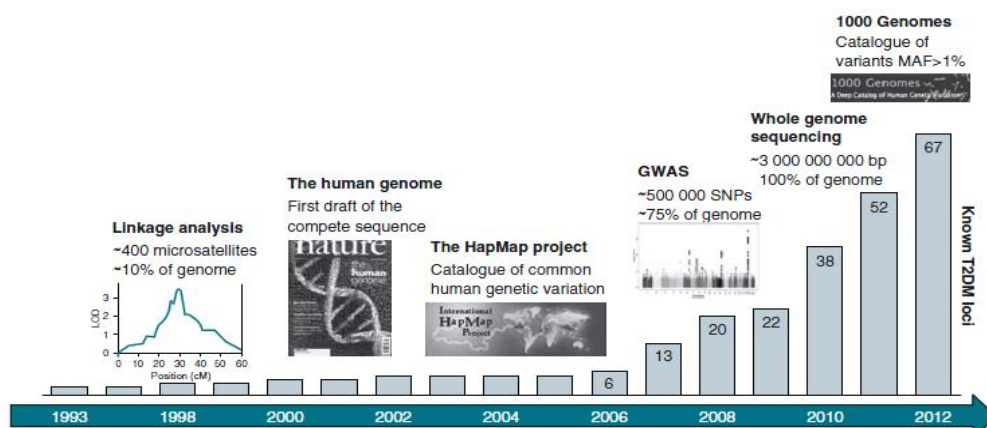
Οι μελέτες γενετικής σύνδεσης βασίζονται στην τάση των γονιδίων, των γενετικών δεικτών, καθώς και των διάφορων πολυμορφισμών που σχετίζονται με ασθένειες να κληρονομούνται από κοινού λόγω της κοντινής τους θέσης στο ίδιο χρωμόσωμα. Ενώ η ανάλυση γενετικής σύνδεσης είναι μία απλή προσέγγιση, έχει σχετικά φτωχά αποτελέσματα, καθώς μόνο μερικές εκατοντάδες δείκτες συνήθως γονοτυπούνται σε ολόκληρο το γονιδίωμα και οι περιοχές που προσδιορίζονται με αυτή μπορούν να περιλαμβάνουν εκατομμύρια ζεύγη βάσεων και εκατοντάδες γονίδια. Ενώ αυτή η μέθοδος είναι αρκετά επιτυχής στην ανίχνευση σπάνιων παραλλαγών με μεγάλη επίδραση στη νόσο (π.χ., κλασικές διαταραχές ενός γονιδίου), αποδείχτηκε ανεπιτυχής στον εντοπισμό γονιδίων που εμπλέκονται σε πολύπλοκες πολυγονιδιακές διαταραχές. Αυτές οι μελέτες αποκάλυψαν μόνο δύο γονίδια, την καλπαΐνη 10 (*CAPN10*) και το μεταγραφικό παράγοντα *TCF7L2* που αναγνωρίζονται ως συνδεδεμένα με το διαβήτη τύπου 2 (Omar A., 2013; DeFronzo R. A. et al., 2015). Το *TCF7L2* ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση του προγλυκογόνου και έτσι την παραγωγή του GLP-1 (γαστρεντερική ορμόνη) (McCarthy MI, 2010).

Μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS)

Ο διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2) είναι μια κοινή μεταβολική διαταραχή που έχει μια ισχυρή γενετική συνιστώσα. Πολύ λίγα γονίδια που σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΤ2 ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την προσέγγιση του υποψήφιου γονιδίου και τις μελέτες γενετικής σύνδεσης, αλλά με την ανάπτυξη των μελετών συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS) πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός πολλαπλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων αρκετών που δεν ήταν προηγουμένως γνωστό ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην ασθένεια (Εικόνα 2). Η ταχεία βελτίωση στην υψηλή τεχνολογία για γονοτύπηση SNPs και η διαθεσιμότητα των δεδομένων του HarMap (Εικόνα 3), κατέστησε δυνατή τη σάρωση εκατοντάδων χιλιάδων SNPs (Εικόνα 4) (Omar A., 2013; DeFronzo R. A. et al., 2015).

Locus	Chr	Risk allele frequency	OR (95%CI)
NOTCH2	1	0.11	1.13 (1.08-1.17)
PROX1	1	0.5	1.07 (1.05-1.09)
IRS1	2	0.61	1.19 (1.13-1.25)
THADA	2	0.92	1.15 (1.10-1.20)
RBMS1/ITGB6	2	0.57	1.11 (1.08-1.16)
BCL11A	2	0.46	1.08 (1.06-1.10)
GCKR	2	0.62	1.06 (1.04-1.08)
IGF2BP2	3	0.29	1.17 (1.10-1.25)
PPARG	3	0.92	1.14 (1.08-1.20)
ADCY5	3	0.78	1.12 (1.09-1.15)
ADAMTS9	3	0.81	1.09 (1.06-1.12)
WFS1	4	0.27	1.13 (1.07-1.18)
ZBED3	5	0.26	1.08 (1.06-1.11)
CDKAL1	6	0.31	1.12 (1.08-1.16)
JAZF1	7	0.52	1.10 (1.07-1.13)
GCK	7	0.2	1.07 (1.05-1.10)
KLF14	7	0.55	1.07 (1.05-1.10)
DGKB/TMEM195	7	0.47	1.06 (1.04-1.08)
SLC30A8	8	0.75	1.12 (1.07-1.16)
TP53INP1	8	0.48	1.06 (1.04-1.09)
CDKN2A/B	9	0.79	1.20 (1.14-1.25)
TLE4	9	0.93	1.11 (1.07-1.15)
TCF7L2	10	0.25	1.37 (1.28-1.47)
HHEX	10	0.56	1.13 (1.08-1.17)
CDC123/CAMK1D	10	0.23	1.11 (1.07-1.14)
KCNQ1	11	0.61	1.40 (1.34-1.47)
KCNJ11/ABCC8	11	0.5	1.15 (1.09-1.21)
CENTD2	11	0.88	1.14 (1.11-1.17)
MTNR1B	11	0.3	1.09 (1.06-1.12)
KCNQ1	11	0.52	1.08 (1.06-1.10)
HMG2	12	0.1	1.10 (1.07-1.14)
TSPAN8/LGR5	12	0.23	1.09 (1.06-1.12)
OASL/HNF1A	12	0.85	1.07 (1.05-1.10)
PRCI	15	0.22	1.07 (1.05-1.09)
ZFAND6	15	0.56	1.06 (1.04-1.08)
FTO	16	0.45	1.15 (1.09-1.22)
HNF1B	17	0.43	1.12 (1.07-1.18)
DUSP9	X	0.12	1.27 (1.18-1.37)

Εικόνα 2: Γενετικοί τόποι που ταυτοποιήθηκαν με μελέτες συσχέτισης για το ΣΔΤ2 σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS) (Omar A., 2013).



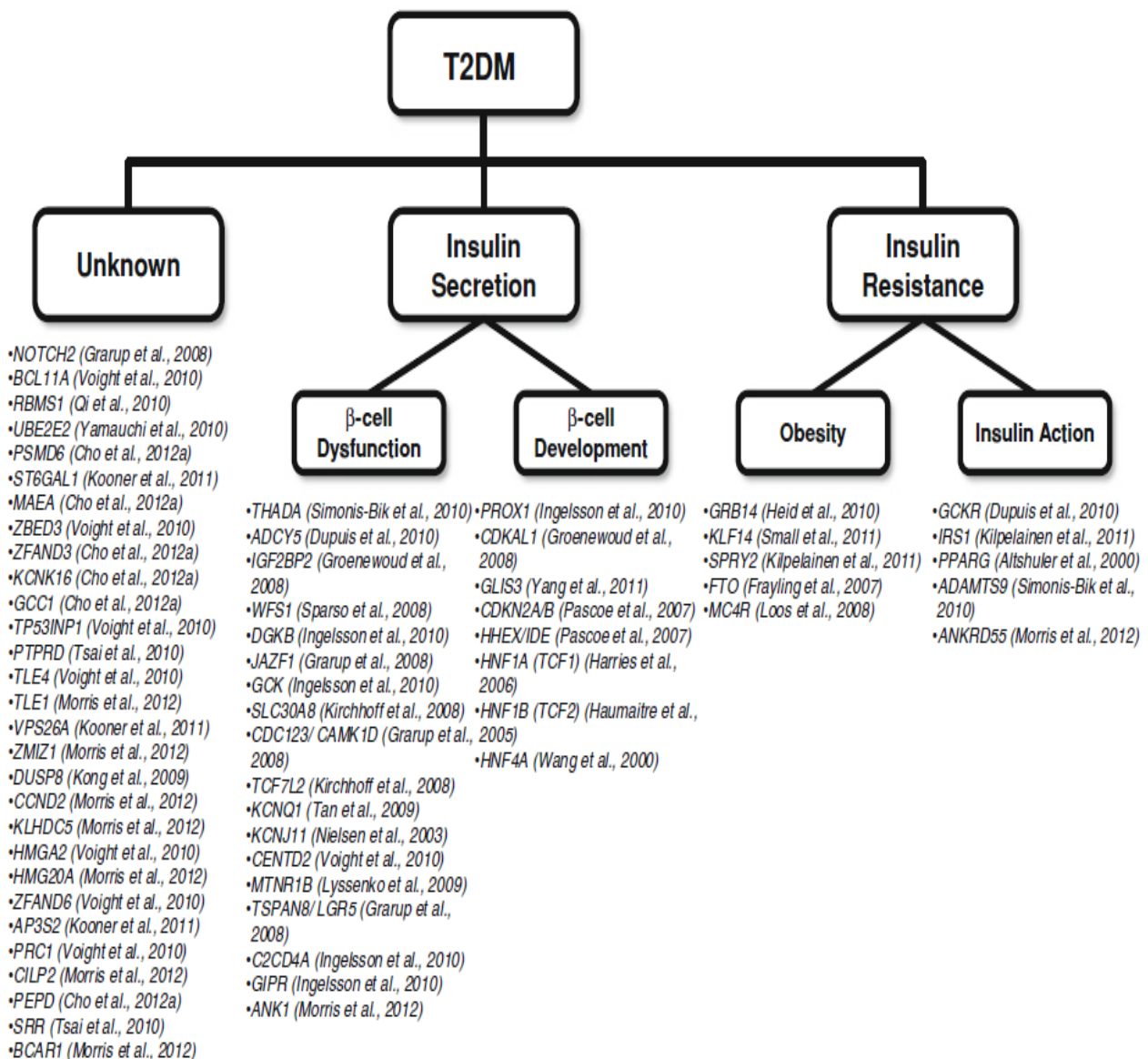
Εικόνα 3: Η εξέλιξη των μεθόδων γενετικής χαρτογράφησης χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει γενετικούς τόπους στο ΣΔΤ2. Οι στήλες δείχνουν την αύξηση του αριθμού των γνωστών γενετικών τόπων ανά έτος με πολύ αργή εξέλιξη, μέχρι την εφαρμογή των GWAS το 2007 (DeFronzo R. A. et al., 2015).

Variants	Candidate gene	Chr	OR	R/NR	RAF
rs4607103	ADAMTS9	3	1.09	C/T	0.81
rs6795735					0.54–0.65
rs2877716	ADCY5	3	1.12	C/T	0.75
rs515071	ANK1	8	1.18	G/A	0.81 (0.80)
rs516946			1.09	C/T	0.81
rs459193	ANKRD55	5	1.08	G/A	0.78
rs2028299	AP3S2	15	1.10	C/A	0.73 ^a (0.31)
rs702634	ARL15	5	1.06	A/G	0.71
rs7202877	BCAR1	16	1.12	T/G	0.89
rs243021	BCL11A	2	1.08	A/G	0.48
rs12454712	BCL2	18	1.09	T/C	0.63
rs7172432	C2CD4A/B	15	1.14	A/G	0.58 (0.56)
rs1048886	C6ORF57	6	1.54	G/A	0.15 (0.18)
rs2975760	CAPN10	2	1.17	C/T	0.15
rs3792267					
rs76895963	CCND2	12	1.9	T/G	0.99
rs12779790	CDC123/	10	1.11	G/A	0.22
rs11257655	CAMK1D		1.15	C/T	0.74 (0.56)
rs10906115			1.13	A/G	0.64 (0.62)
rs7754840	CDKAL1	6	1.12–1.42	C/G	0.34 (0.40)
rs2206734			1.20	T/C	0.16 (0.41)
rs4712523			1.27	G/A	0.34 (0.41)
rs10946398			1.12	C/A	0.34
rs7766070			1.21–1.26	A/C	0.25
rs10811661	CDKN2A/2B	9	1.20–1.35	T/C	0.80 (0.56)
rs10965250			1.20	G/A	0.80
rs2383208			1.19–1.31	A/G	0.79 (0.58)
rs7018475			1.35	G/T	0.73
rs564398			1.12	T/C	0.57
rs1552224	CENTD2	11	1.14	A/C	0.87
rs13292136	CHCHD9	9	1.11	C/T	0.93
rs10401969	CILP2	19	1.13	C/T	0.10
rs3794991			1.12	T/C	0.08
rs5945326	DUSP9	X	1.18–1.27	A/G	0.78 (0.61)
rs17106184	FAF1	1	1.10	G/A	0.91
rs12010175	FAM58A	X	1.21	G/A	0.94 (0.79)
rs6017317	FTM2	20	1.09	G/T	0.18 (0.48)
rs8050136	FTO	16	1.17	A/C	0.46
rs9939609			1.25 (obese)	A/T	0.46
rs11642841			1.13	A/C	0.47
rs9936385			1.13	C/T	
rs6467136	GCC1	7	1.11	G/A	0.50 (0.79)
rs7041847	GLIS3	9	1.10	A/G	0.55 (0.41)
rs10814916			1.11	C/A	0.43 (0.44)
rs11787792	GPSM1	9	1.15	A/G	0.87
rs3923113	GRB14	2	1.09	A/C	0.59 (0.74)
rs13389219			1.07	C/T	0.56
rs10886471	GRK5	10	1.12	C/T	0.52 (0.78)
rs1111875	HHEX	10	1.13	C/T	0.58
rs5015480			1.13–1.18 (obese)	C/T	0.58
rs7178572	HMG20A	15	1.09–1.14 (obese)	G/A	0.68 (0.52)
rs7177055			1.08	A/G	0.71
rs1531343	HMGGA2	12	1.10	C/G	0.12
rs7957197	HNF1A	12	1.07	T/A	0.85
rs7305618			1.14	C/T	0.80
rs4430796	HNF1B	17	1.19	G/A	0.51 (0.28)
rs4812829	HNF4A	20	1.09	A/G	0.16 (0.29)
rs2334499	HCCA2	11	1.35	T/C	0.45
rs4402960	IGF2BP2	3	1.14	T/G	0.30
rs1470579			1.15	C/A	0.30 (0.33)
rs2943641	IRS1	2	1.19	C/T	0.63
rs7578326			1.11	A/G	0.65
rs864745	JAZF1	7	1.10	T/C	0.49
rs849134			1.13	A/G	0.54

Variants	Candidate gene	Chr	OR	R/NR	RAF
rs5219	KCNJ11	11	1.14	T/C	0.47
rs5215			1.14	C/T	0.40
rs2237892	KCNQ1	11	1.25–1.32	C/T	0.92 (0.61, 0.67)
rs231362			1.08	G/A	0.52
rs2237895			1.29	C/T	NA (0.33)
rs1535500	KCNK16	6	1.08	T/G	0.47 (0.42)
rs972283	KLF14	7	1.07	G/A	0.55
rs10842994	KLHDC5	12	1.10	C/T	0.80
rs8090011	LAMA1	18	1.13	G/C	0.32
rs6808574	LPP	3	1.07	C/T	0.60
rs6815464	MAEA	4	1.13	C/G	NA(0.58)
rs7656416			1.15	C/T	NA (0.68)
rs12970134	MC4R	18	1.08	A/G	0.28
rs791595	MIR129-LEP	7	1.17	A/G	0.08
rs4275659	MPHOSPH9	12	1.06	C/T	0.67
rs1387153	MTNR1B	11	1.09	T/C	0.27
rs10830963			1.09	G/C	0.30
rs10923931	NOTCH2/ADAM30	1	1.13	T/G	0.09
rs35658696	PAM	5	1.23	G/A	0.02
rs10229583	PAX4	7	1.14	G/	0.83
rs3786897	PEPD	19	1.10	A/G	0.61 (0.56)
rs3130501	POU5F1-TCF19	6	1.07	G/A	0.74
rs1801282	PPARG	3	1.14	C/G	0.90
rs13081389			1.24	A/G	0.95
rs8042680	PRC1	15	1.07	A/C	0.26
rs831571	PSMD6	3	1.09	C/T	0.77 (0.61)
rs17584499	PTPRD	9	1.57	T/C	0.23 (0.07)
rs7403531	RASGRP1	15	1.1	T/C	0.28 (0.34)
rs7560163	RND3	2	1.33	G/C	1.00 (0.87)
rs7593730	RBMS1	2	1.11	T/C	0.83
rs9552911	SGCG	13	1.5	G/A	0.92
rs13342232	SLC16A11-SLC16A13	17	1.29	G/A	0.02 (0.28)
rs312457			1.20	G/A	0.08
rs13266634	SLC30A8	8	1.12	C/T	0.76
rs11558471			1.15	A/G	0.75
rs3802177			1.26–1.58 (obese/lean)	G/A	0.76
rs1359790	SPRY2	13	1.15	G/A	0.73 (0.71)
rs391300	SRR	17	1.28	G/A	0.63 (0.63)
rs4523957			1.27	T/	0.62 (0.65)
rs9505118	SSR1-RREB1	6	1.06	A/G	0.61
rs16861329	ST6GAL1	3	1.09	G/A	0.88 (0.75)
rs7903146	TCF7L2	10	1.4	T/C	0.28
rs4506565			1.34	T/A	0.30
rs7901695			1.37	C/T	0.28 (0.04)
rs7578597	THADA	2	1.15	T/C	0.88
rs2796441	TLE1	9	1.07	G/A	0.61
rs6813195	TMEM154	4	1.08	C/T	0.72
rs998451	TMEM163	2	1.56	G/A	0.86
rs896854	TP53INP1	8	1.06	T/C	0.44
rs7961581	TPAN8-LGR5	12	1.09	C/T	0.25
rs6780569	UBE2E2	3	1.21	G/A	0.91 (0.83)
rs1802295	VPS26A	10	1.08	A/G	0.35 (0.26)
rs10010131	WFS1	4	1.11	G/A	0.68
rs6446482			1.11	G/C	0.75
rs1801214			1.13	T/C	0.74
rs4457053	ZBED3	5	1.08	G/A	0.26
rs9470794	ZFAND3	6	1.12	C/T	0.12 (0.27)
rs11634397	ZFAND6	15	1.06	G/A	0.64
rs12571751	ZMIZ1	10	1.08	A/G	0.53

Εικόνα 4: Γενετικοί τόποι που σχετίζονται με κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΤ2. R/NR: risk/no risk, (αλληλόμορφο κινδύνου), RAF: συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου κινδύνου στον HarMap σε μελέτη αναφοράς για τους μη Ευρωπαίους (DeFronzo R. A. et al., 2015).

Οι πρόσφατες εξελίξεις σε μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος έφεραν επανάσταση στις γνώσεις μας σχετικά με τη γενετική του ΣΔΤ2. Ωστόσο, ο παθοφυσιολογικός ρόλος των παραλλαγών που έχουν βρεθεί είναι ως επί το πλείστον άγνωστος και απαιτείται περαιτέρω λειτουργικός χαρακτηρισμός (Εικόνα 5). Οι παραλλαγές που έχουν ληφθεί μέχρι στιγμής έχουν μικρή επίδραση και αντιστοιχούν σε λιγότερο από το 10% της κληρονομικότητας του διαβήτη (Kwak S. H. et al., 2013).



Εικόνα 5: Προτεινόμενη λειτουργία των γονιδίων που σχετίζονται με ΣΔΤ2 (Kwak S. H. et al., 2013).

Είναι αξιοσημείωτο ότι μέχρι σήμερα η πλειονότητα των γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με διαβήτη τύπου 2 σχετίζονται με την έκκριση ινσουλίνης και όχι με την αντίσταση στη δράση αυτής (Billings L.K. et al., 2010).

Στο σύνολό τους, οι γενετικές θέσεις που έχουν ανακαλυφθεί έως σήμερα μπορούν να εξηγήσουν μόνο ένα μικρό ποσοστό της παρατηρούμενης κληρονομικότητας. Οι συζητήσεις που γίνονται στον επιστημονικό κόσμο αφορούν τις πιθανές εξηγήσεις για αυτό που ονομάζεται «missing heritability» συμπεριλαμβανομένου του ρόλου των σπάνιων αλληλομόρφων, τις αλληλεπιδράσεις γονιδίων-περιβάλλοντος και την επιγενετική (Omar A., 2013).

2.2 Οι ινκρετίνες GLP-1, GIP και ο ρόλος τους στο ΣΔΤ2

2.2.1 Το φαινόμενο της ινκρετίνης

Κατά τη διατροφή του ανθρώπου, η είσοδος θρεπτικών συστατικών στο γαστρεντερικό σωλήνα προκαλεί την έκκριση πολλών γαστρεντερικών ορμονών που ρυθμίζουν την κινητικότητα του στομάχου, του εντέρου και της χοληδόχου κύστης, την έκκριση γαστρικών και παγκρεατικών ενζύμων, τη συστολή της ουροδόχου κύστης, αλλά και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, οι γαστρεντερικές ορμόνες διευκολύνουν τόσο τη διάθεση, όσο και τη χρησιμοποίηση των θρεπτικών συστατικών (κυρίως της γλυκόζης), διεγείροντας την έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Η λειτουργική αυτή σύνδεση του γαστρεντερικού σωλήνα με την ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος ονομάζεται «φαινόμενο της ινκρετίνης» (Καζάκος Κ., 2009; Baggio L. L et al., 2007).

2.2.2 Οι ινκρετίνες GIP και GLP-1 και οι υποδοχείς τους

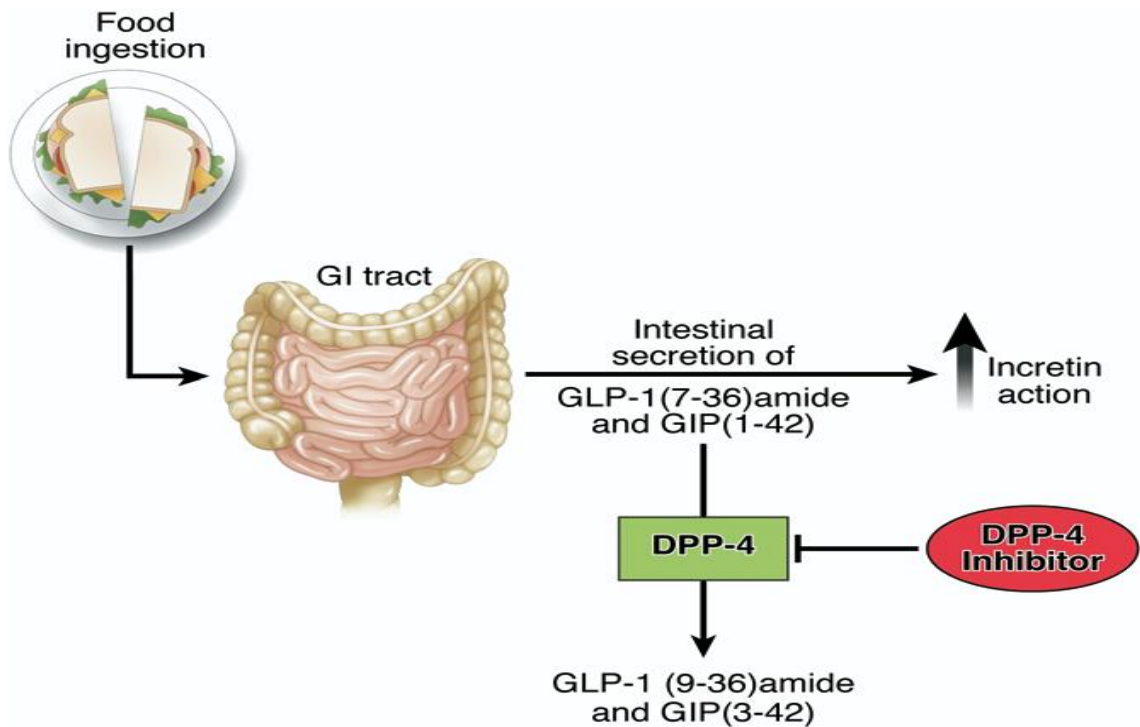
Οι ινκρετίνες είναι ορμόνες του εντέρου που προκαλούν την έκκριση ινσουλίνης σε απόκριση στην πρόσληψη τροφής. Απελευθερώνονται κατά την διάρκεια των γευμάτων με την αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, δρουν ινσουλινοτρόπως και είναι υπεύθυνες για περίπου τα τρία τέταρτα της συνολικής έκκρισης ινσουλίνης. Το GLP-1 και το GIP είναι οι δύο πιο σημαντικές ορμόνες και

πιστεύεται ότι συνεισφέρουν εξίσου στην επίδραση αυτή (Holst J.J., 2013; Song X. et al., 2015).

Το GIP είναι μια γαστρεντερική ορμόνη που αποτελείται από 42 αμινοξέα κι εκκρίνεται από τα K κύτταρα του εντέρου, ως απόκριση στην είσοδο τροφής (Schirra J. et al., 2006). Το GLP-1 είναι επίσης μια γαστρεντερική ορμόνη που εκκρίνεται από τα ενδοκρινή κύτταρα στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου που εκφράζουν το γονίδιο του προγλυκαγόνου, τα λεγόμενα κύτταρα L (Holst J.J., 2013).

Το προγλυκογόνο στο πάγκρεας παράγει το γλυκογόνο, ενώ στα L κύτταρα του εντέρου παράγει το GLP-1. Η ορμόνη αυτή απελευθερώνεται από τα L κύτταρα, τα οποία βρίσκονται κυρίως στον ειλέο και στο κόλον, ως απόκριση στη λήψη τροφής και ειδικότερα, στους υδατάνθρακες και απαντάται σε δύο μοριακούς τύπους, τον 7-36 και τον 7-37 (Schirra J. et al., 2006).

Τα επίπεδα του GLP-1 στο πλάσμα είναι χαμηλά σε κατάσταση νηστείας και κυμαίνονται από 5 έως 10 pmol / L, ενώ αυξάνονται ταχέως μετά το φαγητό φθάνοντας στα 15-50 pmol / L, όπως και του GIP. Ο χρόνος ημιζωής τόσο του GLP-1 όσο και του GIP είναι λιγότερο από 2 λεπτά, διότι διασπάται και αποικοδομείται ταχέως από το ένζυμο διπεπτιδυλική πεπτιδάση-4 (DPP-4) (Εικόνα 6) (Baggio L. L. et al., 2007).



Εικόνα 6: Έκκριση των ορμονών GIP και GLP-1 αμέσως μετά την κατάποση τροφής. Το ένζυμο DPP-4 μετατρέπει ταχύτατα τις ορμόνες αυτές στους ανενεργούς μεταβολίτες τους, GLP-1 (9-36) και GIP (3-42) (Baggio L. L. et al., 2007).

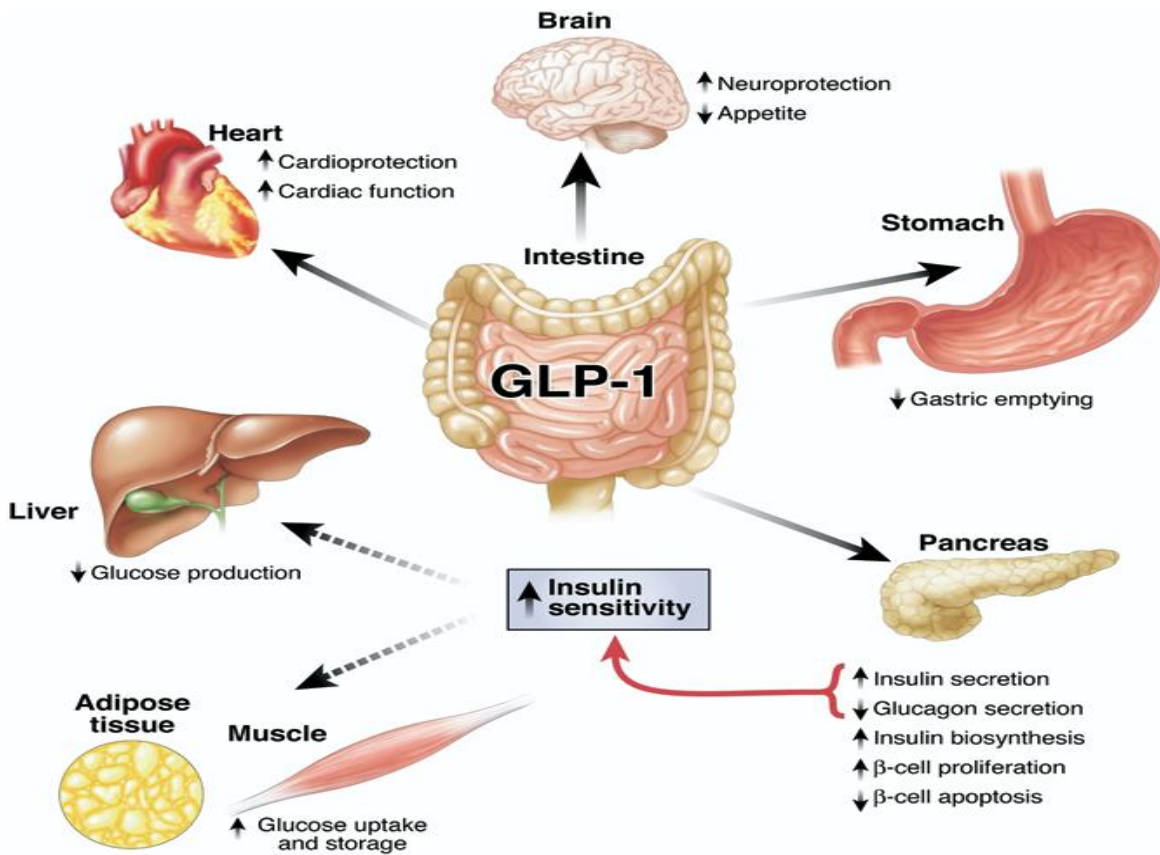
Η δράση των ινκρετινικών πεπτιδίων GIP και GLP-1 επιτυγχάνεται μετά τη σύνδεσή τους με ειδικούς υποδοχείς τύπου G-πρωτεΐνης. Οι υποδοχείς του GIP (GIPR) και GLP-1 (GLP-1R) ανήκουν στη β τάξη της υπερικογένειας των ετεροτριμερών G υποδοχέων με 7 διαμεμβρανικά τμήματα (GPCRs) (Καζάκος Κ., 2009; Kimple M. E. et al., 2014). Και οι δύο υποδοχείς αποτελούνται από 463 αμινοξέα και παρουσιάζουν κατά 90% ταυτόσημη αλληλουχία αμινοξέων. Το ανθρώπινο γονίδιο GLP-1R έχει μήκος 40 kb, αποτελείται από 7 εξόνια κι έχει χαρτογραφηθεί στη χρωματοσωμική περιοχή 6 p21.1, ενώ το ανθρώπινο γονίδιο GIPR αποτελείται από 14 εξόνια και βρίσκεται στην περιοχή 19 q13.3 (Baggio L. L. et al., 2007).

Ο υποδοχέας GIP κατά κύριο λόγο εκφράζεται στα β κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων και σε μικρότερο βαθμό στο λιπώδη ιστό και στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Αντίθετα, ο υποδοχέας του GLP-1 (GLP-1R) εκφράζεται στα α και β κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων και σε περιφερικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος, την καρδιά, τους νεφρούς, τους πνεύμονες, και το γαστρεντερικού σωλήνα (Drucker D. J et al., 2006).

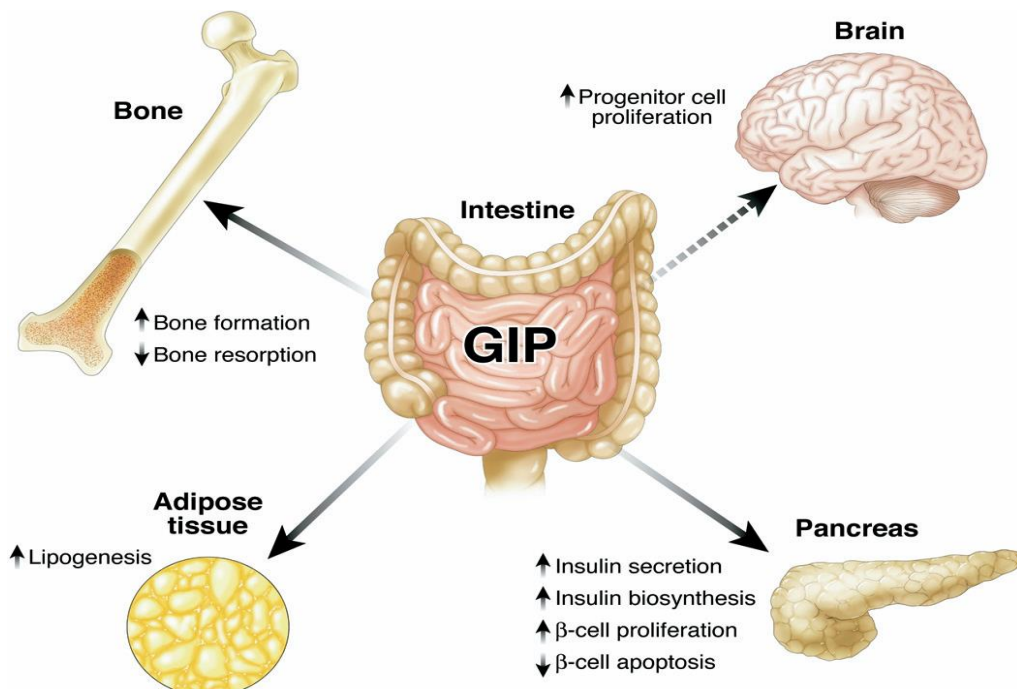
Η σηματοδότηση GLP-1 μέσω του υποδοχέα του (GLP-1R) έχει ένα σημαντικό ρόλο και κατά τη διεύθυνση: έντερο-ήπαρ-εγκέφαλος. Εκτός από το ρόλο του ως ινκρετίνη που προέρχεται από το έντερο, το GLP-1 δρα και ως ένα νευροπεπτίδιο, καθώς παράγεται από τους προγλυκογόνους νευρώνες στον πυρήνα της μονήρους οδού. Το mRNA του GLP-1R και η πρωτεΐνη που αυτό παράγει εκφράζεται ευρέως στον εγκέφαλο του ανθρώπου και του αρουραίου. Έχει δειχθεί επίσης ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα GLP-1 (GLP-1R) εξασθενεί τις ενισχυτικές ιδιότητες της αλκοόλης στα τρωκτικά (Suchankova P. et al., 2015).

2.2.3 Οι φυσιολογικές δράσεις των GIP και GLP-1 στο πάγκρεας

Η ενεργοποίηση των δύο ινκρετινικών υποδοχέων, GLP-1R και GIPR, στα β κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων οδηγεί σε ταχεία αύξηση των επιπέδων του cAMP και του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, που οδηγεί τελικά σε αύξηση της έκκρισης ινσουλίνης. Επιπλέον, προωθείται η αντίσταση στην απόπτωση και η αυξημένη επιβίωση των β-κυττάρων (Drucker D.J. et al., 1987). Η παρατεταμένη διάρκεια σύνδεσης με τους υποδοχείς προκαλεί την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A και την επαγωγή μεταγραφής γονιδίων αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα βιοσύνθεσης νέας ινσουλίνης και τη διέγερση του πολλαπλασιασμού των β κυττάρων (Drucker D.J., 2006). Στις Εικόνες 7 και 8 απεικονίζονται οι δράσεις του GLP-1 και του GIP στους περιφερικούς ιστούς αντίστοιχα.



Εικόνα 7: Οι δράσεις του GLP-1 στους περιφερικούς ιστούς (Baggio L. L. et al., 2007).



Εικόνα 8: Οι δράσεις του GIP στους περιφερικούς ιστούς (Baggio L. L. et al., 2007).

2.2.4 Ο ρόλος του GLP-1 και του GLP-1R στην ομοιόσταση της γλυκόζης

Το GLP-1 αποτελεί σημαντική συνιστώσα του φαινομένου της ινκρετίνης και είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη. Με βάση τις μελέτες στις οποίες συνθετικό GLP-1 ή αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1), χορηγούνται σε ανθρώπους έχει αποδειχθεί ότι το GLP-1 έχει ένα ευρύ φάσμα από δράσεις που προάγουν την ομοιόσταση της γλυκόζης, συμπεριλαμβανομένης της διέγερσης έκκρισης ινσουλίνης, την καταστολή της απελευθέρωσης γλυκαγόνης (Schirra J. et al., 2006), την καθυστέρηση της γαστρικής κένωσης, και την αύξηση της ηπατικής ισορροπία της γλυκόζης (Salehi M. et al., 2010). Το GLP-1 στα κύτταρα αναστέλλει την έκκριση του γλυκογόνου κατά τρόπο γλυκοζοεξαρτώμενο. Αυτό σημαίνει ότι σε συνθήκες υπογλυκαιμίας διατηρείται η αντιρροπιστική έκκριση του γλυκογόνου. Αυτές οι δράσεις συμβάλλουν στον έλεγχο της ρύθμισης της γλυκόζης (Drucker D.J., 2006).

2.2.5 Ινκρετίνες και ανάλογα των ινκρετινών ως θεραπευτικοί παράγοντες στο ΣΔΤ2

Στο διαβήτη τύπου 2, η συνολική επίδραση ινκρετινών είναι μειωμένη. Το GIP αλλά όχι το GLP-1 δείχνει αισθητά εξασθενημένη ινσουλινοτροπική δράση σε ασθενείς με ΣΔΤ2, αν και η έκκρισή του μετά τη λήψη τροφής δε διαταράσσεται. Επιπλέον, τα άτομα με διαβήτη τύπου 2 παρουσιάζουν μια μικρή αλλά σημαντική μείωση στα επίπεδα έκκρισης GLP-1 μετά την είσοδο τροφής στον οργανισμό, αλλά διατηρείται η ικανότητά του να διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης (Nauck M.A. et al., 1993; Toft-Nielsen M.B. et al., 2001; Drucker D.J., 2006).

Η πλειοτροπική δράση του GLP-1 και GIP για τον έλεγχο της γλυκόζης στο αίμα έχει προκαλέσει ενδιαφέρον ως προς τη χρήση αυτών των παραγόντων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2. Αφού η δράση του GLP-1 παραμένει σχετικά διατηρημένη σε διαβητικούς ασθενείς, οι περισσότερες φαρμακευτικές προσπάθειες που απευθύνονται στην ενδυνάμωση της δράσης της ινκρετίνης για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 έχουν επικεντρωθεί σε αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1) (Drucker D.J., 2006; Baggio L. L. et al., 2007).

Όταν εξωγενές GLP-1 χορηγείται σε ασθενείς η ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος μέσω της ενδογενούς έκκρισης ινσουλίνης αποκαθίσταται (Barnett A. H., 2012).

Η θεραπευτική χρήση του GLP-1 τείνει να ομαλοποιήσει την ευαισθησία των άλφα και βήτα κυττάρων στη γλυκόζη οδηγώντας σε βελτιωμένο γλυκαιμικό έλεγχο και στη μείωση της διαβητικής τοξικότητας. Εκτός από τη ρύθμιση αυτή, έχει και μια σειρά φυσιολογικών επιδράσεων όπως τη ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος και του μεταβολισμού. Το GLP-1 επίσης θεωρείται ότι εμποδίζει πολλά στάδια της αθηροσκλήρωσης (Song X. et al., 2015).

Η θεραπευτική χρήση του GLP-1 προσφέρει πολλά οφέλη, όπως:

- Διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης κατά γλυκοζοεξαρτώμενο τρόπο, αποκαθιστά την πρώτη φάση έκκρισης ινσουλίνης και αυξάνει τη μεταγευματική ώση ινσουλίνης στα άτομα με ΣΔΤ2.
- Μειώνει την υπεργλυκαιμία που χαρακτηρίζει τον ΣΔΤ2.
- Μειώνει την πρόσληψη τροφής και το σωματικό βάρος.
- Μπορεί να καθυστερήσει ή και να ανατρέψει την πορεία του διαβήτη (Μελινώδης Α., 2006).

Τα φάρμακα που βασίζονται στην ινκρετίνη κάνουν χρήση της υπογλυκαιμικής δράσης της γαστρεντερικής ορμόνης GLP-1, η οποία διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης που εξαρτάται από τη γλυκόζη, καταστέλλει την έκκριση γλυκαγόνης, επιβραδύνει τη γαστρική κένωση, μειώνει την όρεξη και την πρόσληψη τροφής, και μπορεί να έχει κι άλλες δράσεις στο νευρικό και στο καρδιαγγειακό σύστημα (DeFronzo R. A. et al., 2015).

Η χρήση όμως του GLP-1 στην κλινική πράξη είναι δύσκολη, αφού ο χρόνος ημίσειας ζωής του είναι μόνο 1-2 λεπτά επειδή καταβολίζεται από το ένζυμο DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4) και συνεπώς η χρησιμότητά του θεραπευτικού παράγοντα στην θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 είναι περιορισμένη (Ladenheim E. E., 2015). Για να αντιμετωπιστεί αυτό το μειονέκτημα, αναπτύχθηκαν φάρμακα με δράση GLP-1 ανθεκτικά στη δράση του DPP-4 και φάρμακα που αναστέλλουν το ένζυμο DPP-4. Τα πρώτα είναι αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1), ονομάζονται ανάλογα GLP-1, ινκρετινομιμητικά ή ανάλογα ινκρετινών και προκαλούν παράταση της δράσης του GLP-1 και τα δεύτερα ονομάζονται αναστολείς

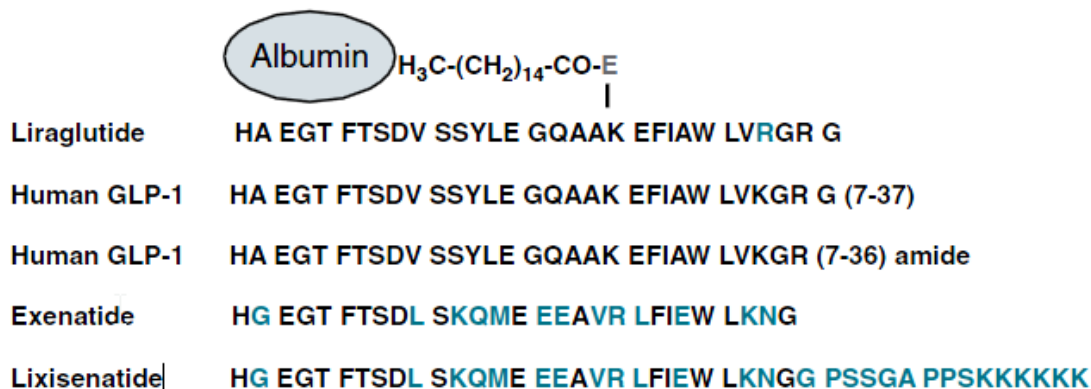
του DPP-4 (Μελινώδης Α., 2006). Στην Εικόνα 9 παρουσιάζονται οι βιολογικές δράσεις του GLP-1, των μιμητικών ινκρετίνης και των αναστολέων DPP-4.

Εικόνα 9: Οι βιολογικές δράσεις του GLP-1, των μιμητικών ινκρετίνης και των αναστολέων DPP-4 (Drucker D.J., 2006).

	Biological actions of incretin hormone in type 2 diabetes	Native GLP-1*	Incretin mimetics		DPP-4 inhibitors (eg. vildagliptin, sitagliptin)
			Exenatide	Liraglutide	
Characteristic features of type 2 diabetes					
Defective glucose-stimulated insulin secretion	Glucose-dependent stimulation of insulin secretion	Yes ¹⁶	Yes ¹⁶	Yes ¹⁶	Yes ¹⁷
Lack of biphasic response†	Restoration of biphasic responses	Yes ¹⁸	Yes ¹⁹	Not tested	Not tested
Slow insulin secretory response to meals ²⁰	More adequate insulin secretory response after meals‡	Yes ^{21,31}	Yes ¹⁶	Yes ¹⁶	Yes ¹⁷
Reduction in or absence of incretin effect ¹⁵	Replacement of incretin activity, greater incretin effect§	Yes‡	Yes‡	Yes‡	Not tested, but probable
Hyperglucagonaemia ²²	Suppression of glucagon secretion	Yes ¹⁶	Yes ¹⁶	Yes ¹⁶	Yes ¹⁷
Hypoglycaemia counter-regulation	Glucagon secretion, when plasma glucose is low	Yes ²¹	Yes ³¹	Yes ³⁴	Not tested
Reduced pancreatic β-cell insulin content	Increased synthesis of proinsulin	Yes ³⁵	Yes	Yes	Yes
Reduced endocrine pancreatic β-cell mass ^{24,37}	Increase in pancreatic islet β-cell mass	Yes ³⁸	Yes ³⁹	Yes ⁴⁰	Yes ⁴¹
	Differentiation of islet precursor cells into β cells	Yes ⁴²	Yes	Yes	Unknown
Abnormally high rate of β-cell apoptosis ³⁷	Inhibition of toxin-induced β-cell apoptosis	Yes ⁴³	Yes ⁴⁴	Yes ⁴⁵	Probable ⁴⁶
Normal, decelerated or accelerated ⁴⁷ gastric emptying	Deceleration in gastric emptying	Yes ⁴⁸	Yes ⁴⁹	Yes ⁴⁶	Marginal ^{20,21}
Hypercaloric energy intake/obesity ¹⁷	Suppression of appetite/induction of satiety	Yes ³	Yes ⁴	Yes ⁵	No obvious effect
	Weight loss (figure 3)	Yes ²	Yes ⁵⁻⁷	Yes ²	No weight change ³⁴
Pharmacological characteristics					
Mode of administration		Intravenous, subcutaneous	Subcutaneous	Subcutaneous	Orally
Frequency of administration		Continuous	Twice daily	Once daily	Once (or twice) daily
Predominant adverse event		Nausea	Nausea	Nausea	None noted

Οι αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1) είναι πεπτίδια (Εικόνα 10) που χορηγούνται με υποδόρια ένεση (όπως η ινσουλίνη) και έχουν πολύ μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από το φυσικό GLP-1. Η συχνότητα χορήγησής τους διαφέρει μεταξύ των διαφόρων φαρμάκων, ανάλογα με τη διάρκεια της δράσης τους. Η εξενατίδη είναι βραχείας δράσης μιμητικό του GLP-1 και χορηγείται δις ημερησίως, η λιραγλουτίδη είναι μακράς δράσης ανάλογο του GLP-1 και χορηγείται άπαξ ημερησίως και η λιξισενατίδη με χορήγηση άπαξ την

εβδομάδα. Τα φάρμακα που βασίζονται στην ινκρετίνη έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν προκαλούν υπογλυκαιμικά επεισόδια λόγω του γλυκοζοεξαρτώμενου μηχανισμού τους (DeFronzo R. A. et al., 2015).



Εικόνα 10: Πεπτιδικές αλληλουχίες του GLP-1 και των αγωνιστών του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1) (DeFronzo R. A. et al., 2015).

Αυτά τα φάρμακα είναι διαθέσιμα για χρήση ως μονοθεραπεία, δηλαδή επιπρόσθετα στη δίαιτα και την άσκηση του ασθενή ή σε συνδυασμό με υπογλυκαιμικούς παράγοντες που χορηγούνται από το στόμα σε ενήλικες με ΣΔΤ2 (Olokoba A. B. et al., 2012).

Η θεραπεία με χορήγηση εξωγενούς GLP-1 μειώνει τη συνολική ενεργειακή πρόσληψη μέσω της καθυστέρησης της γαστρικής κένωσης και την αύξηση του κορεσμού και κατά συνέπεια, μπορεί να προκαλέσει απώλεια βάρους στο μέσο ασθενή, αλλά υπάρχει σημαντική ετερογένεια μεταξύ των ασθενών όσον αφορά την ευαισθησία τους προς την απώλεια βάρους που προκαλείται από τη διέγερση του υποδοχέα GLP-1 (Barnett A. H., 2012; DeFronzo R. A. et al., 2015).

Στη στόχευση του συστήματος ινκρετινών, τα ανάλογα του GLP-1 δρουν κυρίως για τη μείωση της μεταγευματικής γλυκόζης του πλάσματος (PPG), παρά για τη μείωση της γλυκόζης του πλάσματος προγευματικά (FPG) και συνεπώς μπορεί να έχουν μεγαλύτερη χρησιμότητα σε ασθενείς με σημαντική ανύψωση του PPG. Στις κλινικές δοκιμές, βρέθηκε ότι μειώνουν τη γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c), τόσο ως μονοθεραπεία όσο και σε συνδυασμό με άλλα αντιδιαβητικά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένης της ινσουλίνης. Συγκεκριμένα, μελέτες LEAD (Liraglutide

Effect and Action in Diabetes, δηλαδή μελέτες της επίδρασης και του μηχανισμού δράσης της λιραγλουτιδης στο διαβήτη) που συνέκριναν τη λιραγλουτιδη με τις υπάρχουσες θεραπείες μείωσης της γλυκόζης, όπως η εξενατίδη και η ινσουλίνη έδειξαν μείωση της HbA1c από 0,8 έως 1,5% με ποσότητα χορήγησης λιραγλουτιδης 1,2 mg και 1,8 mg, η οποία συνοδεύεται από χαμηλά ποσοστά υπογλυκαιμίας και απώλεια βάρους (Barnett A. H., 2012).

Η κυριότερη, ανεπιθύμητη ενέργεια των φαρμάκων αυτών είναι η εμφάνιση ναυτίας, σε αρκετά μεγάλο ποσοστό ασθενών, η οποία βελτιώνεται μερικώς με την πάροδο του χρόνου. Κάποιου βαθμού ανησυχία προκάλεσε η αύξηση αναφοράς επεισοδίων οξείας παγκρεατίτιδας μετά την κυκλοφορία τους. Προς το παρόν συνιστάται η άμεση διακοπή τους εάν εμφανιστούν συμπτώματα που μπορεί να οφείλονται σε παγκρεατίτιδα (Καζάκος Κ., 2009).

2.2.6 Φάρμακα ανάλογα των ινκρετινών

- **ΕΞΕΝΑΤΙΔΗ**

Η εξενδίνη-4 είναι ένα πεπτίδιο 39 αμινοξέων που απομονώθηκε από τη σίελο της *Heloderma suspectum* (Gila Monster), μιας σαύρας στην Αριζόνα. Η εξενδίνη είναι μεγαλύτερο πεπτίδιο από το μόριο GLP-1 και εμφανίζει περίπου 53% κοινή ομολογία αμινοξέων με το GLP-1. Η εξενατίδη είναι το συνθετικό παράγωγο της εξενδίνης-4, διαθέτει τις βιολογικές δράσεις του GLP-1, είναι ανθεκτική στη δράση του DPP 4, διότι έχει στη θέση 8 μία Gly στη θέση μιας Ala κι έχει χρόνο ημίσειας ζωής 2 ώρες. Διατίθεται στην αγορά με το εμπορικό όνομα Byetta® (Καζάκος, 2009; DeFronzo R. A. et al., 2015; Ladenheim E. E., 2015).

Η εξενατίδη εγκρίθηκε από το FDA το 2005 και στην Ευρώπη το 2006 ως συμπληρωματική θεραπεία για τους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, οι οποίοι απέτυχαν να ανταποκριθούν στη μετφορμίνη ή στις σουλφονουλουρίες (Ladenheim E. E., 2015). Η εξενατίδη διατίθεται σήμερα για τη θεραπεία των ασθενών με ΣΔΤ2 σε πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένων των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (ΗΠΑ), της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) και χώρες της Λατινικής Αμερικής. Η εξενατίδη χορηγείται δύο φορές την ημέρα ημερησίως (5 ή 10 mcg), 1

ώρα πριν από τα δύο κύρια γεύματα της ημέρας (Davidson J. A. et al., 2008). Επίσης, χορηγείται με υποδόρια ένεση και αποβάλλεται από τους νεφρούς, μέσω σπειραματικής διήθησης (Chia C. W. et al., 2008).

Το GLP-1 έχει ένα σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση της ινσουλίνης και την ομοιοστάση της γλυκόζης του εγκεφάλου και ο υποδοχέας του εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο. Η εξενατίδη έχει νευροτροφικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες *in vitro*. Οι μηχανισμοί που διέπουν αυτές τις ιδιότητες δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί. Οι ευνοϊκές δραστηριότητες της εξενατίδης πιθανότατα να βασίζονται στην επαγωγή ενός μεταβολικού διακόπτη προς την αναερόβια γλυκόλυση όπως και στην αυξημένη παραγωγή γαλακτικού, δύο φαινόμενα που μπορεί να τροφοδοτήσουν τους νευρώνες του εγκεφάλου. Επιπλέον, αυτή η μεταβολική μετατόπιση μπορεί να χρησιμεύει και στον νευροπροστατευτικό ρόλο, εξουδετερώνοντας το οξειδωτικό στρες στον εγκέφαλο (Bomba M. et al. 2013).

Η επιτυχία της χορήγησης εξενατίδης δύο φορές την ημέρα με ενέσιμη θεραπεία σχετίζεται εν μέρει με την ικανότητα των αγωνιστών του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1) να μειώνουν την HbA1c χωρίς αυτή η μείωση να συνοδεύεται από αύξηση του σωματικού βάρους στην πλειονότητα των ατόμων που έλαβαν θεραπεία. Πράγματι, η θεραπεία με εξενατίδη συσχετίστηκε με σημαντική μείωση της HbA1c (περίπου 0.8%), με το 62% των ασθενών να έχει μείωση της HbA1c μικρότερης του 7% από την αρχική τιμή 7,9%, σε συνδυασμό με μία μέση απώλεια βάρους 1,5 kg. Συνεπώς, τα περισσότερα άτομα που έλαβαν εξενατίδη έχουν απώλεια βάρους, η οποία στο περίπου 20% των ασθενών μπορεί να είναι ουσιαστική. Αυτό βρίσκεται σε έντονη αντίθεση με την αύξηση του σωματικού βάρους που παρατηρείται συχνά με το πρότυπο των αντιδιαβητικών παραγόντων θεραπείας του ΣΔΤ2, συμπεριλαμβανομένης της ινσουλίνης, των σουλφονουλουρίων ή των θειαζολιδινεδιόνων (Baggio L. L. et al., 2007).

- **ΛΙΡΑΓΛΟΥΤΙΔΗ**

Η λιραγλουτίδη είναι ένα ανάλογο της ινκρετίνης και ορμόνης κορεσμού GLP-1 και μειώνει την ενεργειακή πρόσληψη, προάγει την απώλεια βάρους και την ελευθέρωση ινσουλίνης που διεγείρεται από τη γλυκόζη (Lean M.E.J. et al., 2014).

Η λιραγλουτίδη είναι ένα μακράς δράσης ανάλογο ινκρετίνης και ήταν το πρώτο μόριο που σχεδιάστηκε κι αναπτύχθηκε ως ένας αγωνιστής του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1). Αναπτύχθηκε από τη Novo Nordisk και διατίθενται στην αγορά με το εμπορικό όνομα Victoza®. Το βασικό πεπτίδιο έχει τροποποιηθεί ελαφρώς σε σύγκριση με το GLP-1 με ομολογία 97%. Ένα κατάλοιπο λυσίνης στην αμινοξική θέση 34 έχει αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο αργινίνης, και προστέθηκε ένα γλουταμινικό οξύ κι ένα ελεύθερο λιπαρό οξύ (FFA) με 16 άτομα άνθρακα σε ένα κατάλοιπο λυσίνης στην αμινοξική θέση 26. Αυτή η πλευρική αλυσίδα FFA θεωρείται ότι μπορεί να προωθήσει τη μη ομοιοπολική πρόσδεση της λιραγλουτίδης με την αλβουμίνη κι ως εκ τούτου, την αύξηση της ημιζωής στο πλάσμα μέσω προστασίας από τη νεφρική κάθαρση. Επίσης, της επιτρέπει να δεσμεύεται σε κυκλοφορούσες πρωτεΐνες του πλάσματος, επιβραδύνοντας έτσι την απορρόφησή της. Η μη ομοιοπολική σύζευξη λιραγλουτίδης-λευκωματίνης σχηματίζει μια δεξαμενή, από την οποία μπορεί να απελευθερωθεί λιραγλουτίδη. Αυτή μπορεί να διαχυθεί στους ιστούς και να προσδεθεί σε υποδοχείς (Chia C. W., et al., 2008; DeFronzo R. A. et al., 2015; Ladenheim E. E., 2015).

Αν και τα αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο δεν έχουν αλλάξει σε σχέση με το φυσικό πεπτίδιο GLP-1, το DPP-4 δύσκολα επιτίθεται στη λιραγλουτίδη, πιθανότατα επειδή η πλευρική αλυσίδα FFA μπορεί να προκαλεί στερεοχημική παρεμπόδιση. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της λιραγλουτίδης είναι περίπου 10-14 ώρες. Με μία υποδόρια ένεση, οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα παραμένουν αυξημένες μετά από 24 ώρες, και με επαναλήψεις άπαξ ημερησίως επιτυγχάνεται μια σταθερή κατάσταση συγκεντρώσεων στο πλάσμα μετά από περίπου 5 ημέρες (DeFronzo R. A. et al., 2015).

Υποδόρια χορήγηση λιραγλουτίδης, σε μία δόση έως 1,8 mg την ημέρα έχει εγκριθεί στην ΕΕ και στις ΗΠΑ για τη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Επίσης, 3,0 mg λιραγλουτίδη ανά ημέρα είναι επί του παρόντος υπό έρευνα για τη διαχείριση βάρους (Lean M.E.J. et al., 2014; Can J. V. et al., 2014).

Σύμφωνα με μελέτη των Astru A. et al., (2012), η λιραγλουτίδη με δίαιτα και άσκηση, παρέχει παρατεταμένη απώλεια βάρους άνω των 2 ετών και βελτιώσεις σε πολλούς από τους σημαντικούς μεταβολικούς και καρδιαγγειακούς παράγοντες

κινδύνου που σχετίζονται με την παχυσαρκία. Επίσης, δεν υπήρξαν σημαντικά ζητήματα ασφάλειας, επιβεβαιώνοντας τα δεδομένα από μελέτες σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 σε δόσεις λιραγλουτίδης έως 1,8 mg (Astru A. et al., 2012).

- **ΛΙΞΙΣΕΝΑΤΙΔΗ**

Η λιξισενατίδη (lixisenatide) είναι ένας αγωνιστής των υποδοχέων του γλυκαγονόμορφου πεπτιδίου-1 που δρα με τρόπο εξαρτώμενο από τη γλυκόζη για τη βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου σε ενήλικες ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Scott L.J., 2013). Επιδρά στο πάγκρεας και προάγει την παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης. Μιμείται πολλές ευνοϊκές δράσεις του ενδογενούς GLP-1 που έχουν ως αποτέλεσμα βελτιωμένο γλυκαιμικό δείκτη με ελάχιστη ή καθόλου υπογλυκαιμία και απώλεια βάρους (Barnett A. H., 2011).

Όπως και η εξενατίδη, η λιξισενατίδη είναι μια συνθετική μορφή της εξενδίνης-4. Είναι σε θέση να αντέξει τη φυσιολογική αποικοδόμηση με DPP-4 ως αποτέλεσμα της τροποποίησης του C-τερματικού άκρου με έξι κατάλοιπα λυσίνης και διαγραφής μιας προλίνης. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της λιξισενατίδης είναι 2-4 ώρες, και έχει χαρακτηριστεί ως ένας βραχείας δράσης αγωνιστής του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1), σε σύγκριση με τους μακράς δράσης αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1), λιραγλουτίδη και αλμπιγλουτίδη. Παρά το σχετικά σύντομο χρόνο ημίσειας ζωής, η λιξισενατίδη προορίζεται για άπαξ ημερησίως χορήγηση ως αποτέλεσμα της ισχυρής συγγένειας πρόσδεσης της στον υποδοχέα GLP-1 (Barnett A. H., 2011).

Χορηγείται υποδόρια άπαξ ημερησίως μετά το γεύμα και ενδείκνυται για τη θεραπεία ενήλικων ασθενών με διαβήτη τύπου 2, για την επίτευξη του ελέγχου του γλυκαιμικού δείκτη σε συνδυασμό με από του στόματος αντι-υπεργλυκαιμικά φάρμακα και / ή βασική ινσουλίνη όταν αυτά τα αντι-υπεργλυκαιμικά φάρμακα δεν παρέχουν επαρκή γλυκαιμικό έλεγχο (Scott L.J., 2013).

Παρά την εξαιρετικά σημαντική αποτελεσματικότητα των αναλόγων του GLP-1 στη θεραπεία ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, οι κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι ένα ποσοστό 10-25% δεν ανταποκρίνεται θετικά (κυρίως όσον αφορά την μείωση της HbA1c) στην θεραπεία, το οποίο πιθανόν να μπορεί να προβλεφθεί βάσει του γενετικού προφίλ του ασθενούς και την ύπαρξη δεικτών που συσχετίζονται είτε

με τον μηχανισμό δράσης του φαρμάκου είτε με παραμέτρους της παθοφυσιολογίας της ασθένειας (Trujillo J. M. et al., 2015).

2.3 Φαρμακογενετική και σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

2.3.1 Φαρμακογενετική

Η φαρμακογενετική είναι η ένωση της κλασικής φαρμακολογίας με τη γενετική του ανθρώπου (Gurwitz D. et al., 2005) και ορίζεται ως η επιρροή παραλλαγών στην αλληλουχία του DNA στην ανταπόκριση των φαρμάκων. Η σπουδαιότητά της προκύπτει από την κλινική παρατήρηση ότι οι ασθενείς που πάσχουν από την ίδια ασθένεια δεν ανταποκρίνονται όλοι με τον ίδιο τρόπο στην ίδια φαρμακευτική αγωγή. Ο κύριος στόχος της φαρμακογενετικής είναι η παροχή εξατομικευμένης θεραπείας, προσαρμοσμένη σε ένα άτομο με συγκεκριμένο γενετικό προφίλ, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της φαρμακευτικής αγωγής (Brunetti A. et al., 2014).

Δηλαδή, η φαρμακογενετική αποτελεί τον προάγγελο της εξατομικευμένης ιατρικής, μια παραδειγματική στροφή από τη νοοτροπία του «ένα φάρμακο ταιριάζει σε όλους» στο «το κατάλληλο φάρμακο για τον κατάλληλο ασθενή, στην κατάλληλη δόση και χρόνο». Αυτό δεν σημαίνει ότι κάθε ασθενής θα πρέπει να αντιμετωπίζεται με διαφορετικό τρόπο, αλλά ότι οι ασθενείς χωρίζονται σε ομάδες με βάση γενετικούς και άλλους δείκτες που μπορούν προβλέψουν την εξέλιξη της νόσου και την έκβαση της θεραπείας (Sade'e W. et al., 2005).

Κλινικές παρατηρήσεις των κληρονομικών διαφορών στις επιδράσεις των φαρμάκων τεκμηριώθηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950, δημιουργώντας τον τομέα της φαρμακογενετικής, και αργότερα της φαρμακογενωμικής. Παρά το γεγονός ότι οι δύο όροι είναι συνώνυμοι για τους πρακτικούς σκοπούς, η φαρμακογενωμική χρησιμοποιεί προσεγγίσεις σε ολόκληρο το γονιδίωμα για τη διαλεύκανση της βάσης κληρονόμησης των διαφορών στην απόκριση στα φάρμακα μεταξύ των ατόμων (Evans W. E. et al., 2003).

Ο όρος "φαρμακογενετική" επινοήθηκε για πρώτη φορά από τον Vogel το 1959 για να περιγράψει την ύπαρξη γενετικών διαφορών που σχετίζονται με τη δράση των φαρμάκων (Brunetti A. et al., 2014).

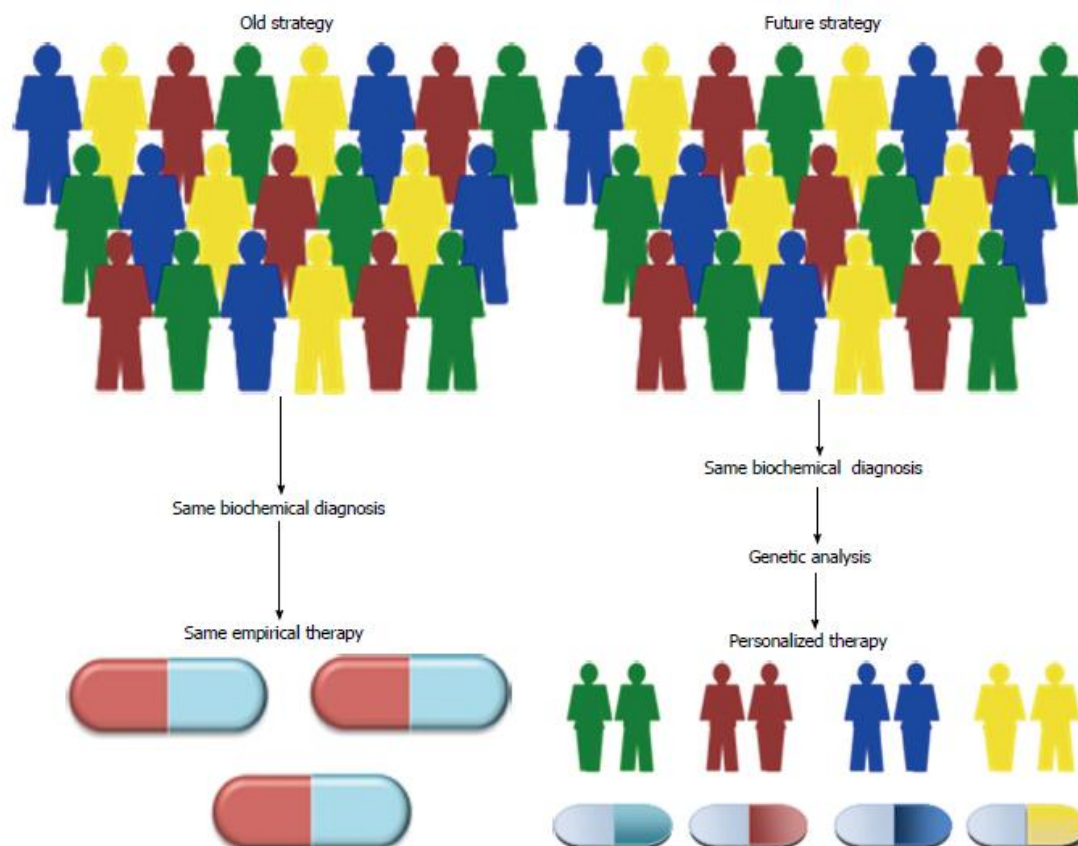
Η φαρμακογενετική αποτελεί ένα νέο κλάδο των βιολογικών επιστημών, που στοχεύει στο σχεδιασμό και την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων που θα βασίζονται σε συγκεκριμένο γενετικό χαρακτηριστικό του ασθενούς ή ομάδας ασθενών, με σκοπό να περιοριστούν στο ελάχιστο οι ανεπιθύμητες ενέργειες (παρενέργειες) του φαρμάκου και ταυτόχρονα να αυξηθεί η αποτελεσματικότητά του σε θεραπευτικό επίπεδο. Είναι απόλυτα εξακριβωμένο σήμερα ότι τόσο η αποτελεσματικότητα όσο και οι παρενέργειες ενός φαρμάκου εξαρτώνται από διάφορους γενετικά καθορισμένους παράγοντες, όπως την απορρόφηση και την κατανομή του στους ιστούς, το μεταβολισμό του, τη συγκέντρωσή του στο σημείο στόχο και τον αριθμό και τη μορφολογία των υποδοχέων δράσης του (Καναβάκης Ε. και συν, 2001).

Η κοινή παρατήρηση ότι οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 δείχνουν μεγάλη μεταβλητότητα στην ανταπόκριση στην ίδια φαρμακευτική αγωγή υποδεικνύει τη σημασία της εξατομικευμένης προσέγγισης, στην οποία η πλέον κατάλληλη θεραπεία υποδεικνύεται από τις γενετικές ιδιαιτερότητες του κάθε ατόμου. Η εισαγωγή των μελετών GWAS το 2007 έχει ενισχύσει σε μεγάλο βαθμό τον αριθμό των γονιδίων που είναι γνωστό ότι συνδέονται με κοινές ασθένειες. Εφαρμόστηκαν σε μεγάλους πληθυσμούς ασθενών κι επέτρεψαν την ταυτοποίηση πολλών γενετικών παραλλαγών οι οποίες συνδέονται με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Brunetti A. et al., 2014).

Ωστόσο, όπως και με άλλες πολύπλοκες ασθένειες, καμία από τις επιμέρους παραλλαγές που προσδιορίστηκαν μέχρι στιγμής είναι καθαυτή επαρκής για να προκαλέσει την ασθένεια, αλλά στις περισσότερες ο γενετικός κίνδυνος για διαβήτη τύπου 2 μεσολαβείται από τη συνδυασμένη επίδραση από περισσότερες γενετικές παραλλαγές που ξεχωριστά η κάθε μία έχει μόνο μικρό βαθμό κινδύνου. Αυτός ο συνδυασμός (απλότυπος) ορίζει το γενετικό προφίλ του ατόμου (Brunetti A. et al., 2014).

Ως εκ τούτου, η αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους οι γενετικές παραλλαγές μπορεί να προκαλέσουν διαφορές στα φαινοτυπικά γνωρίσματα και στην ατομική απόκριση του φαρμάκου είναι απαραίτητη όχι μόνο για τον προσδιορισμό του αιτιολογικού ρόλου των παραλλαγών του γονιδίου, αλλά και για τον εντοπισμό νέων εξατομικευμένων ιατρικών λύσεων. Η εξατομικευμένη θεραπεία με βάση τη γενετική ποικιλότητα του κάθε ατόμου, είναι μία από τις πιο

συναρπαστικές προκλήσεις της σύγχρονης ιατρικής (Εικόνα 11) (Brunetti A. et al., 2014).



Εικόνα 11: Εξατομικευμένη θεραπεία που βασίζεται στην ατομική γενετική ποικιλότητα (Brunetti A. et al., 2014).

Αν και είναι διαθέσιμη μια ποικιλία από φαρμακολογικές θεραπείες για το ΣΔΤ2, η ανταπόκριση, οι δόσεις και η ανοχή στα φάρμακα είναι εξαιρετικά μεταβλητές σε πολλούς ασθενείς, οι οποίοι ενώ αρχικά ανταποκρίνονται στα αντιδιαβητικά φάρμακα, με το πέρασμα του χρόνου αποτυγχάνουν να αποκριθούν στη μονοθεραπεία. Μέχρι στιγμής, ένας μεγάλος αριθμός παρουσιάζει μεταβλητότητα στην απόκριση των φαρμάκων κι ένας αριθμός παραγόντων ταυτοποιήθηκε ότι συμβάλει σε αυτές τις διαφορές στην απόκριση συμπεριλαμβανομένων της ηλικίας, του φύλου, της νόσου, των ναρκωτικών, των αλληλεπιδράσεων με τρόφιμα, της συννοσηρότητας καθώς και των γενετικών παραγόντων. Γενετική μεταβλητότητα στα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που μεταβολίζουν τα φάρμακα, υποδοχείς φαρμάκων και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι είναι ζωτικής σημασίας παράγοντες που καθορίζουν την

μεταξύ των ατόμων μεταβλητότητα στην απόκριση σε φάρμακα (Liu Z.- Q. et al., 2011).

Τα αποτελέσματα που έχουν επιτευχθεί μέχρι στιγμής με τη μελέτη των γενετικών παραλλαγών σε ασθενείς με ΣΔΤ2 (και άλλες κοινές ασθένειες) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πραγματοποίηση μιας φαρμακογενετικής δοκιμής, η οποία μπορεί να βοηθήσει στη λήψη αποφάσεων σχετικά με τη θεραπεία με βάση το γενετικό προφίλ κάθε ασθενούς, βελτιώνοντας έτσι τη συνολική διαχείριση της ασθένειας και τη διασφάλιση καλύτερων αποτελεσμάτων από την άποψη της ασφάλειας και της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας (Brunetti A. et al., 2014).

Η φαρμακογενετική στόχο έχει την πραγματοποίηση της «εξατομικευμένης θεραπείας» για τον καθορισμό των φαρμάκων και τη δοσολογία τους, για τη μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας της νόσου και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών με ΣΔΤ2 (Liu Z.- Q. et al., 2011).

Η κλινική χρήση της φαρμακογενετικής, μέσω της αναγνώρισης των επιμέρους γενετικών παραλλαγών (γενετικών πολυμορφισμών) μπορεί να συμβάλει σε μια πιο τεκμηριωμένη και λιγότερο εμπειρική κλινική διαχείριση των ασθενών, αποφεύγοντας έτσι αποτυχίες της θεραπείας και μειώνοντας παράλληλα τη συχνότητα εμφάνισης των ανεπιθύμητων ενεργειών των φαρμάκων (Brunetti A. et al., 2014).

Η φαρμακογενετική έρευνα στο διαβήτη τύπου 2 έχει προχωρήσει ήδη στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της υπεργλυκαιμίας, υπογραμμίζοντας το β κύτταρο ως ένα κομβικό σημείο στην παθογένειά της. Επιπλέον, φαρμακογενετική έρευνα έχει ήδη αρχίσει να δίνει την υπόσχεση της εξατομικευμένης θεραπείας για ορισμένες μονογονιδιακές μορφές του διαβήτη (Huangand C. et al., 2011).

2.3.2 Φαρμακογενετικές μελέτες στο ΣΔΤ2

Οι τρέχουσες θεραπείες για τον ΣΔΤ2 περιλαμβάνουν τροποποίηση του τρόπου ζωής και χρήση των από του στόματος αντιδιαβητικών φαρμάκων. Πολλές κατηγορίες αντιδιαβητικών φαρμάκων διατίθενται σήμερα για τη θεραπεία ασθενών με διαβήτη τύπου 2, με τις σουλφονουλourίες (SU), τα διγουανίδια, τις θειαζολιδινοδιόνες (TZDs) και τις μεγλιτινίδες να είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα. Οι επιδράσεις αυτών των φαρμάκων εξαρτώνται από την έκταση της απορρόφησης του φαρμάκου από τον αυλό του εντέρου, την πρόσληψη και το μεταβολισμό του φαρμάκου στο ήπαρ, την έκταση της μεταφοράς του πίσω στην

συστηματική κυκλοφορία για εξωηπατικά αποτελέσματα, καθώς και από την ενεργό νεφρική σωληναριακή έκκριση στα ούρα για τα φάρμακα με σημαντική νεφρική εκκριτική κάθαρση (π.χ. μετφορμίνη) (Semiz S. et al., 2013).

Οι στόχοι των αντιδιαβητικών φαρμάκων, οι κλινικές αποκρίσεις, και τα υποψήφια γονίδια που εμπλέκονται στην απόκριση των ασθενών στα αντι-διαβητικά φάρμακα συνοψίζονται στην Εικόνα 12 (Huangand C. et al., 2011), ενώ στην Εικόνα 13 απεικονίζεται ένας σχηματικός κατάλογος των SNPs που σύμφωνα με μελέτες GWAS, συνήθως συνδέονται με τροποποιημένη ανταπόκριση στα φάρμακα για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 (Pollastro C. et al., 2015).

Drugs	Mechanism of action	Main effect(s)	Potential adverse events	Candidate genes putatively affecting response
Sulfonylureas	ATP-dependent K channel inhibition	↑ Insulin secretion ↓ Glucagon secretion	Hypoglycemia, allergic reaction to sulfa drugs	<i>CYP2C9, ABCB8, KCNJ11, TCF7L2</i>
Metformin	AMP-dependent kinase (AMPK) activation	↑ Insulin sensitivity ↓ Hepatic gluconeogenesis	Lactic acidosis	<i>SLC22A1, SLC47A1, ATM</i>
Thiazolidinediones	Enhance PPAR γ binding to its DNA response element	↑ Glucose uptake by skeletal muscle ↑ Lipolysis ↓ Hepatic glucose output	Fluid overload, congestive heart failure, fractures, hepatotoxicity, bladder cancer	<i>ADIPOQ, CYP2C8</i>
Insulin	Insulin/IGF-1 receptor pathway	↑ Tissue glucose uptake	Hypoglycemia	??
Meglitinides	ATP-dependent K channel inhibition	↑ Insulin secretion ↓ Glucagon secretion	Hypoglycemia	??
α -Glucosidase inhibitors	Inhibit pancreatic α -amylase and intestinal α -glucosidase	Glucose absorption by GI tract	Hypoglycemia	??
Amylin mimetics	Amylin receptor pathway	↓ Gastric emptying rate ↑ Insulin secretion ↓ Glucagon secretion	Hypoglycemia	??
GLP-1 mimetics	GLP-1 receptor pathway	↑ Glucose-dependent insulin secretion ↓ Gastric emptying rate ↑ Satiety ↓ Glucagon secretion	Nausea, vomiting, hypoglycemia, acute pancreatitis, angioedema, anaphylaxis	??
DPP-IV inhibitors	GLP-1 receptor pathway	↑ Glucose-dependent insulin secretion		??

Εικόνα 12: Στόχοι, κλινικές αποκρίσεις και υποψήφια γονίδια που εμπλέκονται στην απόκριση των αντιδιαβητικών φαρμάκων (Huangand C. et al., 2011).

Chr	Position	Localization	Gene	Alleles	SNP ID	Protein change	Association
6	160543148	Exon	SLC22A1	C/T	rs12208357	R61C	Metformin metabolism T2D susceptibility
	160560824	Exon		A/G	rs34130495	G401S	
	160560881	Exon		-/A	rs35167514	420del	
	160575837	Exon		A/C/G	rs34059508	G465R	
6	160670282	Exon	SLC22A2	G/T	rs316019	S270A	Metformin metabolism T2D development
11	17409572	Exon	KCNJ11	T/C	rs5219	K23E	Sulphonylureas metabolism T2D onset
	17408630	Exon		G/A	rs5215	A250I	
10	96702047	Exon	CYP2C9	C/T	rs1799853	R144C	Sulphonylureas metabolism T2D susceptibility
	96741053	Exon		A/C	rs1057910	I359L	
11	17418477	Exon	ABCC8	G/T	rs757110	A1369S	Sulphonylureas metabolism T2D onset
3	12393125	Exon	PPARG	C/G	rs1801282	P12A	T2D metabolism T2D onset- development
10	114808902	Intron	TCF7L2	G/T	rs12255372	—	Sulphonylureas metabolism T2D development
	114758349	Intron		C/T	rs7903146	—	
2	227093745	Intergene	IRS1	C/T	rs2943641	—	Sulphonylureas treatment T2D onset
	227660544	Exon		G/A	rs1801278	G971R	
2	241534293	Intron	CAPN10	Indel	rs3842570	—	Probably involved in Sulphonylureas response
	241531174	Intron		A/G	rs3792267	—	
	241542703	Intron		C/T	rs5030952	—	

Εικόνα 13: Κατάλογος των SNPs που συνήθως σχετίζονται με ΣΔΤ2 και το μεταβολισμό της μετφορμίνης και των σουλφονουριών (Pollastro C. et al., 2015).

Πολυμορφισμοί που σχετίζονται με εκκριταγωγά ινσουλίνης

Εκτός από την αντίσταση στην ινσουλίνη (IR), η ανεπαρκής λειτουργία των παγκρεατικών β-κυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του ΣΔΤ2. Η ανεπαρκής παραγωγή και έκκριση της ινσουλίνης μπορεί να αυξηθεί από εκκριταγωγά φάρμακα, όπως οι σουλφονουριές που συνδέονται με τον υποδοχέα της σουλφονουρίας (SUR) οδηγώντας στην εκπόλωση των κυττάρων και στη διέγερση της απελευθέρωσης ινσουλίνης (Semiz S. et al., 2013).

Οι σουλφονουριές είναι από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους στοματικούς υπογλυκαιμικούς παράγοντες. Οι πιο κοινές σουλφονουριές είναι οι: τολβουταμίδη, γλικλαζίδη, γλιβενκλαμίδη και γλιμεπιρίδη. Αν και οι περισσότεροι ασθενείς ανταποκρίνονται καλά σε αυτά τα φάρμακα, το 10-20% των ατόμων που υφίστανται θεραπεία δεν επιτυγχάνουν επαρκή γλυκαιμικό έλεγχο χρησιμοποιώντας ακόμη και την υψηλότερη συνιστώμενη δόση. Ένα ποσοστό 5-10% των ασθενών που αρχικά ανταποκρίνονται σε σουλφονουρία στη συνέχεια χάνουν σχεδόν την ικανότητα να

διατηρούν τα φυσιολογικά γλυκαιμικά επίπεδα. Παρά το γεγονός ότι η μη ανταπόκριση στη θεραπεία με σουλφονουλουρία μπορεί να προκύψει από μία ποικιλία παραγόντων, ο ισχυρότερος προγνωστικός δείκτης της αποτυχίας είναι η επιδείνωση της λειτουργίας των β-κυττάρων (Torii E., 2014).

Οι σουλφονουλουρίες μεταβολίζονται εκτενώς από το ήπαρ, κυρίως από το ισοένζυμο 2C9 του κυτοχρώματος P450 (CYP2C9). Δύο κοινές μη συνόνυμες της γενετικές παραλλαγές έχουν αναφερθεί για αυτό το γονίδιο, οι CYP2C9 * 2 (Arg144Cys; rs1799853) και CYP2C9 * 3 (Ile359Leu; rs1057910) (Emami-Riedmaier A. et al., 2015).

Φαρμακογενετικές μελέτες έδειξαν ότι οι φορείς δύο αντίγραφων των αλληλομόρφων με μεταλλάξη απώλειας λειτουργίας CYP2C9 * 2 ή CYP2C9* 3 (δηλαδή * 2 / * 2, * 2 / * 3 ή * 3 / * 3, αντιστοιχούν σε 1-2% των Καυκάσιων) εμφανίζουν 0.5% μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) σε σύγκριση με τους φορείς που είναι ομόζυγοι για το αγρίου τύπου αλληλόμορφο και έχουν επίσης 3 με 4 φορές περισσότερες πιθανότητες να επιτύχουν ένα επίπεδο HbA1c μικρότερο του 7% (Emami-Riedmaier A. et al., 2015).

Οι μεγλιτινίδες έχουν σύντομο χρόνο ημίσειας ζωής λόγω της απορρόφησης τους και του γρήγορου μεταβολισμού τους στο ήπαρ. Οι φαρμακοκινητικοί παράμετροι αυτών των ενώσεων επηρεάζονται από την πρόσληψη τους από τους μεταφορείς, όπως το πολυπεπτιδίο μεταφοράς ανιόντων 1B1, OATP1B1, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SLCO1B1* και βρίσκεται στην ημιτονοειδή μεμβράνη των ανθρώπινων ηπατοκυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι οι γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *SLCO1B1*, ιδίως ο πολυμορφισμός c.521T> C (Val174Ala; rs4149056), επηρεάζει τη φαρμακοκινητική της ρεπαγλινίδης, αλλά όχι της νατεγλινίδης. Μελέτες σε υγιείς εθελοντές έδειξε μία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φορέων του αλληλομόρφου CYP2C9 * 3, σε σύγκριση με του αγρίου τύπου, όσον αφορά την φαρμακοκινητική της νατεγλινίδης, ενώ το αλληλόμορφο CYP2C9 * 2 δεν φαίνεται να έχει σημαντική φαρμακοκινητική επίδραση (Emami-Riedmaier A. et al., 2015).

Τα εσωτερικά κανάλια ιόντων καλίου των παγκρεατικών νησιδίων (KATP) που είναι ευαίσθητα στο ATP συναρμολογούνται από την υπομονάδα Kir6.2 και τον υποδοχέα σουλφονουλουρίας (SUR1), που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *KCNJ11* και *ABCC8* αντίστοιχα. Αυτό το κανάλι είναι απαραίτητο για την

γλυκοζοεξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης από τα β-παγκρεατικά κύτταρα και ρυθμίζει την πρόσληψη γλυκόζης από τους σκελετικούς μύες, την παραγωγή γλυκόζης και την απελευθέρωσή της από το ήπαρ. Τα τελευταία χρόνια πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) των γονιδίων που κωδικοποιούν το κανάλι KATP έχουν συσχετιστεί με την αποτελεσματικότητα των εκκριταγωγικών φαρμάκων (Semiz S. et al., 2013).

Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας των γονιδίων *KCNJ11* και *ABCC8* είναι η πιο κοινή αιτία των συγγενών υπερινσουλιναιμιών, με πάνω από 150 μεταλλάξεις να έχουν χαρακτηριστεί στον υποδοχέα σουλφονυλουρίας SUR1 (*ABCC8*) και 24 στην υπομονάδα Kir6.2 (*KCNJ11*). Επίσης, μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας στο Kir6.2 ή στο SUR1 προκαλούν νεογνικό διαβήτη (Semiz S. et al., 2013).

Ένας κοινός πολυμορφισμός, ο Glu23Lys (επίσης γνωστός ως E23K) στο γονίδιο *KCNJ11* συνδέεται με την ανάπτυξη ΣΔΤ2 καθώς και με αυξημένο κίνδυνο αποτυχίας στη θεραπεία με σουλφονυλουρία. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *KCNJ11* έχουν επίσης συνδεθεί με αλλοιωμένη απόκριση στη θεραπεία με γλιβενκλαμίδα και λανθασμένη διάγνωση του διαβήτη τύπου 1. Πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι διαβητικοί ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *KCNJ11* θα μπορούσαν να αποκριθούν πιο αποτελεσματικά σε θεραπεία με σουλφονυλουρία από ότι με ινσουλίνη. Δύο κοινές παραλλαγές του KATP, οι E23K και S1369A, των γονιδίων *KCNJ11* και *ABCC8* αντίστοιχα, βρίσκονται σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης και σχηματίζουν έναν απλότυπο που φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για ΣΔΤ2 (Semiz S. et al., 2013).

Φαρμακογενετικές μελέτες σε 525 ασθενείς με ΣΔΤ2 που δεν ανταποκρίθηκαν για δεύτερη φορά στη θεραπεία με σουλφονυλουρία έχουν δείξει ότι οι φορείς του «K» αλληλομόρφου κινδύνου του πολυμορφισμού E23K του γονιδίου *KCNJ11* έδειξαν τάση προς μικρότερη διάρκεια ανταπόκρισης στη θεραπεία σε σύγκριση με αυτούς που ήταν ομόζυγοι για το κοινό αλληλόμορφο «E». Τα παγκρεατικά νησίδια των φορέων του αλληλομόρφου «K» έδειξαν σημαντικά χαμηλότερη απελευθέρωση ινσουλίνης που διεγείρεται από γλιβενκλαμίδα (Semiz S. et al., 2013).

Φαρμακογενετικές μελέτες σε 228 διαβητικούς ασθενείς που τους χορηγήθηκε θεραπεία με σουλφονουλουρία έδειξαν ότι οι ομόζυγοι φορείς του κοινού αλληλομόρφου C του πολυμορφισμού exon 16-3C>T (rs1799854) του γονιδίου *ABCC8* έχουν σημαντικά χαμηλότερο HbA1c σε σύγκριση με τους ομόζυγους φορείς του αλληλομόρφου «T». Επίσης, οι ομόζυγοι φορείς του κοινού αλληλομόρφου «G» του πολυμορφισμού Arg1273Arg (rs1799859) είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα HbA1c και τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με τους ομόζυγους φορείς του αλληλομόρφου «A» (Semiz S. et al., 2013).

Πρόσφατες *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η παραλλαγή Ser1369Ala του γονιδίου *ABCC8* αλλάζει την ευαισθησία του καναλιού KATP για εκκριταγωγικά φάρμακα που συνδέονται με την A-θέση (π.χ. γλικλαζίδη), αλλά όχι για εκείνα που συνδέονται με τη B-θέση (π.χ. ρεπαγλινίδη) ή με την A και B θέση (π.χ. γλιπιζίδη και γλιβενκλαμίδη) (Emami-Riedmaier A. et al., 2015).

Οι παραλλαγές με τις πιο ισχυρές και επαναλήψιμες συσχετίσεις με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΤ2 σε πολλές μελέτες ταυτοποιήθηκαν στον παράγοντα μεταγραφής *TCF7L2*. Το γονίδιο *TCF7L2* λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής της παραγωγής και της επεξεργασίας της ινσουλίνης (Emami-Riedmaier A. et al., 2015).

Η μεγαλύτερη μελέτη για τη συσχέτιση μεταξύ των παραλλαγών του γονιδίου *TCF7L2*, rs12255372 και rs7903146 και της ανταπόκρισης των ασθενών με ΣΔΤ2 στη θεραπεία με σουλφονουλουρία ήταν η go-DARTS, η οποία περιελάμβανε 901 διαβητικούς ασθενείς που τους χορηγήθηκε θεραπεία με σουλφονουλουρία. Διαπιστώθηκε ότι οι πιθανότητες να μην επιτευχθεί η μείωση της HbA1c σε ποσοστό λιγότερο από 7% εντός της περιόδου των 3-12 μηνών μετά την έναρξη της θεραπείας, ήταν διπλάσιες στους ομόζυγους φορείς του αλληλομόρφου κινδύνου «T» του rs12255372 του γονιδίου *TCF7L2* σε σύγκριση με τους ομόζυγους φορείς του αλληλομόρφου «G». Παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί και για τον πολυμορφισμό rs7903146 (Emami-Riedmaier A. et al., 2015).

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο βαθμός της μείωσης των επιπέδων της HbA1c και της γλυκόζης του πλάσματος προγευματικά (FPG) μετά από μια συνδυασμένη θεραπεία με σουλφονουλουρία και μετφορμίνη σχετίζονταν με τον πολυμορφισμό rs7903146 (C>T) του γονιδίου *TCF7L2*. Άτομα που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 κι έχουν ομόζυγο γονότυπο για το αλληλόμορφο κινδύνου «T» ήταν

λιγότερο πιθανό να ανταποκριθούν στη θεραπεία με σουλφονυλουρία (Semiz S. et al., 2013).

Πολυμορφισμοί που σχετίζονται με τα διγουανίδια

Η μετφορμίνη (ένα διγουανίδιο) είναι από τα πιο ευρέως συνταγογραφούμενα φάρμακα και έχει γλυκορυθμιστικό αποτέλεσμα στην παρουσία της ενδογενούς ινσουλίνης (βελτιώνει την υπεργλυκαιμία), μειώνοντας: α) την απορρόφηση της γαστρεντερικής γλυκόζης, β) την ενδογενή ηπατική παραγωγή γλυκόζης, γ) την περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη και την αύξηση της δράση της ινσουλίνης σε ορισμένα όργανα στόχους, όπως στους μυς (Huang Q. et al. 2011).

Η μετφορμίνη συνταγογραφείται συχνά για διαβήτη τύπου 2 και έχει πολλά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης της ουδετερότητάς της ως προς το βάρος του ατόμου, του ότι δεν επηρεάζει τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και τον κίνδυνο υπογλυκαιμίας (Cho K. et al., 2015). Η μετφορμίνη ανήκει στα από του στόματος αντιδιαβητικά που χρησιμοποιούνται ευρέως σε υπέρβαρους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Επίσης, είναι συχνά το πρώτο φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαβήτη τύπου 2 στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς. Ωστόσο, μόνο περίπου το 60-65% των ασθενών επιτυγχάνουν τον αποδεκτό έλεγχο των επιπέδων της προγευματικής γλυκόζης. Η μετφορμίνη δε μεταβολίζεται, αλλά υφίσταται ταχεία νεφρική απέκκριση (Torí E., 2014).

Αν και έχει δειχθεί ότι η μετφορμίνη ενεργοποιεί την AMP-εξαρτώμενη κινάση *AMPK*, άλλοι ανεξάρτητοι μηχανισμοί έχουν επίσης προταθεί. Η φαρμακοκινητική της μετφορμίνης περιλαμβάνει τους οργανικούς μεταφορείς κατιόντων *OCT1* και *OCT2* που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *SLC22A1* και *SLC22A2* αντίστοιχα και διαμεσολαβούν στη διαμεμβρανική μεταφορά της μετφορμίνης στα ηπατοκύτταρα και στα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων. (Huangand C. et al., 2011). Η *OCT1* είναι ο κύριος μηχανισμός για την είσοδο μετφορμίνης στα ηπατοκύτταρα και στα εντερικά κύτταρα και παρουσιάζει υψηλή παραλλακτικότητα στους ανθρώπους (Huang Q. et al. 2011). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει μια συσχέτιση ανάμεσα σε ένα καλά μελετημένο πολυμορφισμού της *OCT2* (Ala270Ser; rs316019) και στη νεφρική κάθαρση της μετφορμίνης (Emami-Riedmaier A. et al., 2015).

Επιπλέον, μέχρι σήμερα, αρκετοί πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου έχουν εντοπιστεί στα γονίδια *SLC47A1* και *SLC47A2*. Ο πολυμορφισμός rs2289669 στην

MATE1 έχει συνδεθεί με μείωση της HbA1c στους ασθενείς που κάνουν χρήση μετοφορμίνης. Η πρωτεΐνη *MATE1* (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SLC47A1*) διευκολύνει την απέκκριση της αμετάβλητης μετοφορμίνης στα ούρα και στη χολή (Huangand C. et al., 2011). Επιπλέον, ο πολυμορφισμός g.-130G> A (rs 12943590) στον υποκινητή του *MATE2-K* έχει επίσης συσχετισθεί σε δύο ξεχωριστές μελέτες με τη μείωση της HbA1c στους ασθενείς που κάνουν χρήση μετοφορμίνης. (Huang Q. et al. 2011; Emami-Riedmaier A. et al., 2015).

Μέχρι σήμερα, 25 πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο *SLC22A1*, εκ των οποίων 12 έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τη λειτουργικότητα. Τέσσερις από αυτούς, οι πολυμορφισμοί Gly401Ser (rs34130495), Arg61Cys (rs12208357), Met420del (rs202220802) και Gly465Arg (rs34059508) έχουν μελετηθεί σε συνδυασμό με την υπογλυκαιμική δράση της μετοφορμίνης. Σε φορείς ενός ή περισσότερων παραλλαγών των αλληλομόρφων τα επίπεδα μετοφορμίνης στο πλάσμα βρέθηκαν να είναι υψηλότερα και η επίδραση στη μείωση της γλυκόζης ήταν μειωμένη (Emami-Riedmaier A. et al., 2015).

Πολυμορφισμοί που σχετίζονται με τις θειαζολιδινοδιόνες (TZTS)

Οι θειαζολιδινοδιόνες, επίσης γνωστές ως γλιταζόνες, δρουν γενικά ως αγωνιστές για τους PPARs (Huang Q. et al. 2011). Οι θειαζολιδινοδιόνες δεσμεύουν με μεγαλύτερη ειδικότητα για το PPAR-γ, έναν πυρηνικό παράγοντα μεταγραφής που εκφράζεται σε διάφορους ιστούς στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων των λιποκυττάρων για την προώθηση της λιπογένεσης και την πρόσληψη λιπαρών οξέων. Με τη μείωση της συγκέντρωσης των κυκλοφορούντων λιπαρών οξέων και τη διαθεσιμότητα των λιπιδίων στο ήπαρ και στους μύες, τα φάρμακα αυτά βελτιώνουν την ευαισθησία των ασθενών στην ινσουλίνη και μειώνουν την υπεργλυκαιμία. Επιπλέον, οι θειαζολιδινοδιόνες έχουν ένα πλήθος άλλων θεραπευτικών επιδράσεων που συμπεριλαμβάνουν αντι-φλεγμονώδη αποτελέσματα, βελτίωση της υπέρτασης, της μικρολευκωματουρίας και της ηπατική στεάτωσης (λιπώδες ήπαρ) (Semiz S. et al., 2013).

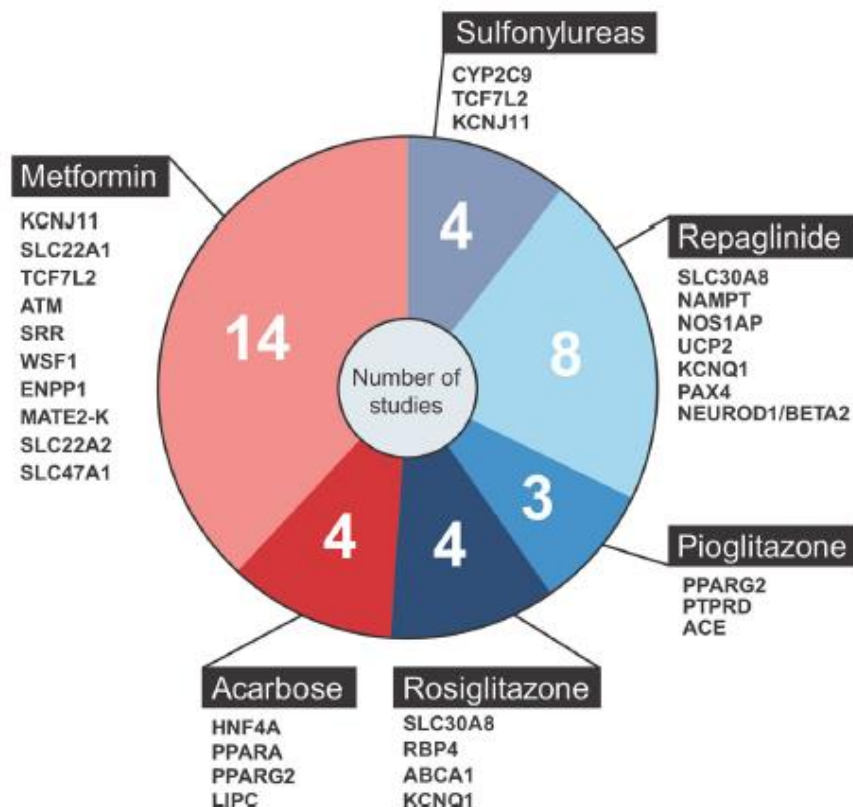
Ένας συγκεκριμένος πολυμορφισμός του γονιδίου *PPARG2*, ο Pro12Ala; rs1801282 μελετήθηκε σε σχέση με το ρόλο του PPAR-γ στο ΣΔΤ2. Σε αρκετές μελέτες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔΤ2 σε φορείς του σπάνιου αλληλομόρφου αυτού του πολυμορφισμού, καθώς και μια μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων της HbA1c και της γλυκόζης νηστείας στο πλάσμα

σε απόκριση στην πιογλιταζόνη και τη ροσιγλιταζόνη (Emami-Riedmaier A. et al., 2015).

Η ροσιγλιταζόνη και η πιογλιταζόνη είναι θειαζολιδινοδιόνες που έχει δειχθεί ότι βελτιώνουν το γλυκαιμικό έλεγχο και ότι επιβραδύνουν την πρόοδο της καταστροφής των β-κυττάρων. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η χρήση της ροσιγλιταζόνης μπορεί να προκαλέσει σοβαρές παρενέργειες, συμπεριλαμβανομένων του αυξημένου κίνδυνου εμφράγματος του μυοκαρδίου και του θανάτου από καρδιαγγειακά αίτια, σε σύγκριση με την πιογλιταζόνη. Έτσι, η μόνη θειαζολιδινοδιόνη που εξακολουθεί να είναι διαθέσιμη στην αγορά είναι η πιογλιταζόνη, η οποία φαίνεται να έχει πιο ευνοϊκή επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 σε σύγκριση με τη ροσιγλιταζόνη (Semiz S. et al., 2013).

Το γονίδιο *PGC1a* είναι ένας ρυθμιστής του PPAR-γ κι έχει συνδεθεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔΤ2. Η *αδιπνεκτίνη* είναι ένα από τα καλύτερα μελετημένα γονίδια σε σχέση με το ΣΔΤ2. Πολυμορφισμοί στα παραπάνω γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί και έχουν περαιτέρω μελετηθεί σε σχέση με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔΤ2. Δύο πολυμορφισμοί, οι Thr394Thr (rs2970847) και Gly482Ser (rs8192678) στο γονίδιο *PGC1a* έχουν συνδεθεί με την ανταπόκριση του ασθενούς στη θεραπεία με ροσιγλιταζόνη αν και δε βρέθηκε καμία συσχέτιση όταν οι επιπτώσεις του πολυμορφισμού Gly482Ser αναλύθηκαν σε ασθενείς στους οποίους είχε χορηγηθεί πιογλιταζόνη. Στην περίπτωση της *αδιπνεκτίνης*, αρκετοί πολυμορφισμοί, οι -11377C> G (rs266729), -10066G> A (rs182052), +45T> G (rs2241766) και +276G> T (rs1501299) έχουν συνδεθεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔΤ2 και την παχυσαρκία (Emami-Riedmaier A. et al., 2015).

Στην Εικόνα 14 παρουσιάζεται μία σύνοψη των γονιδίων που εμπλέκονται σημαντικά στην αλληλεπίδραση γονιδίου-φαρμάκου ως απόκριση στα αντιδιαβητικά φάρμακα που χορηγούνται για τη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.



Εικόνα 14: Γονίδια που εμπλέκονται στην απόκριση σε αντιδιαβητική φαρμακευτική αγωγή (Emami-Riedmaier A. et al., 2015).

2.3.3 Το γονίδιο *TCF7L2* και ο πολυμορφισμός IVS3 C>T (rs7903146)

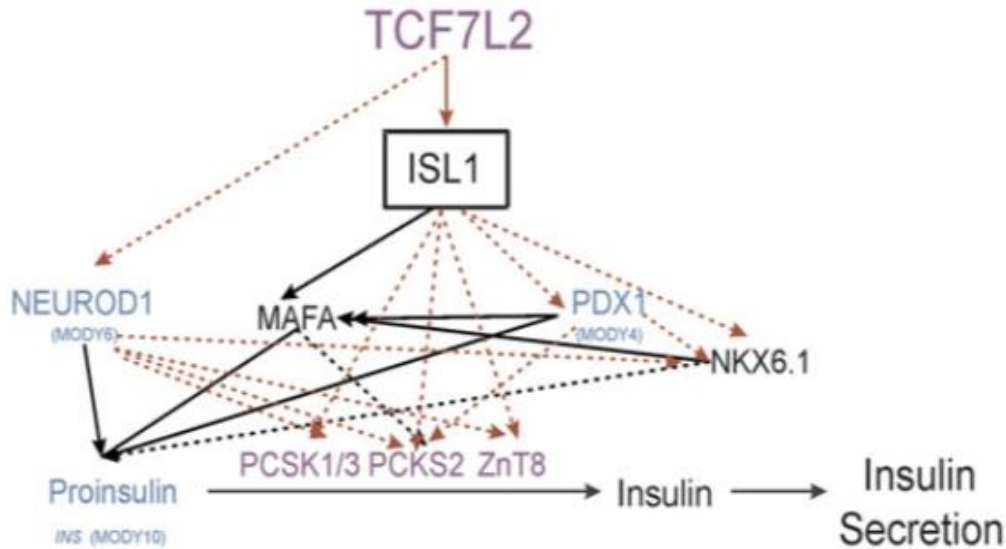
Οι πιο ελπιδοφόροι πολυμορφισμοί γονιδίων που επηρεάζουν την απόκριση των ασθενών στη θεραπεία με σουλφονυλουρίες είναι εκείνοι που εμπλέκονται στην φαρμακοδυναμική του φαρμάκου, όπως αυτοί του γονιδίου *TCF7L2*, το οποίο κωδικοποιεί έναν παράγοντα μεταγραφής (TCF-4), που εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τη διαφοροποίηση (Semiz S. et al., 2013).

Το γονίδιο *TCF7L2* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10, κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που παίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι σηματοδότησης *Wnt* (Sudchada P. et al., 2014) και εκφράζεται σε διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένου του εντέρου και του παγκρέατος. Το μονοπάτι σηματοδότησης *Wnt* διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των B-

κυττάρων, στην έκκριση ινσουλίνης και επηρεάζει τη σύνθεση του GLP-1 στα εντερικά L-κύτταρα (Bacquer O. L. et al., 2011).

Όταν το μονοπάτι σηματοδότησης *Wnt* είναι απενεργοποιημένο, ένα σύμπλοκο που περιλαμβάνει τον *TCF7L2* καταστέλλει τη γονιδιακή έκφραση του *Wnt*. Όταν ενεργοποιηθεί, ο *TCF7L2* σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τη β-κατενίνη για την ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της σηματοδότησης *Wnt*. Αυτή η οδός είναι ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση της κυτταρικής μορφολογίας, τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα, την ογκογένεση και την καταστολή όγκων (Sudchada P. et al., 2014).

Το γονίδιο *TCF7L2* λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής της παραγωγής και της επεξεργασίας της ινσουλίνης. Το *ISL1* είναι ένας άμεσος στόχος του *TCF7L2* και ρυθμίζει την παραγωγή και την επεξεργασία προ-ινσουλίνης μέσω της ρύθμισης των *PCSK1*, *PCSK2*, *SLC30A8*, *MAFA*, *PDX1* και *NKX6*. Αυτοί οι πολλαπλοί στόχοι σε βασικές οδούς μπορούν να εξηγήσουν γιατί το *TCF7L2* έχει αναδειχθεί ως το γονίδιο που δείχνει την ισχυρότερη συσχέτιση με το διαβήτη τύπου 2 (Εικόνα 15). (Zhou Y. et al., 2014).



Εικόνα 15: Το γονίδιο *TCF7L2* αποτελεί το βασικότερο ρυθμιστή της παραγωγής και της επεξεργασίας της ινσουλίνης. Κόκκινα βέλη και μαύρα βέλη: μοριακές συνδέσεις. Άμεσα βέλη: άμεσες μοριακές συνδέσεις. Διακεκομμένα βέλη: έμμεσες μοριακές συνδέσεις. Μπλε σύμβολα γονιδίων: γονίδια MODY. Οι μορφές ΣΔ που σχετίζονται με μονογονιδιακές λειτουργικές διαταραχές των β κυττάρων και χαρακτηρίζονται από την έναρξη της υπεργλυκαιμίας σε νεαρή ηλικία, κατά κανόνα πριν το 25^ο έτος, ονομάζονται MODY (Maturity onset diabetes of the young). Μωβ σύμβολα γονιδίων: γονίδια που συνδέονται με διαβήτη τύπου 2 ή / και γνωρίσματα (προ) ινσουλίνης (Zhou Y. et al., 2014).

Η συσχέτιση μεταξύ του γονιδίου *TCF7L2* και του ΣΔΤ2 ήταν η πρώτη που προσδιορίστηκε από ανάλυση σύνδεσης που χαρτογραφήθηκε στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 10. Χαρτογράφηση στην περιοχή αυτή έδειξε ότι ένας μικροδορυφορικός δείκτης που βρίσκεται στο ιντρόνιο του *TCF7L2* ήταν ισχυρά συνδεδεμένος με τον κίνδυνο για σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Kwak S. H. et al., 2013).

Από το 2006, η ισχυρή συσχέτιση των SNPs στο γονίδιο *TCF7L2*, rs7903146 και rs12255372, με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 έχει επιβεβαιωθεί σε πολυάριθμες μελέτες (Bacquer O. L. et al., 2011). Η ισχυρότερη, όμως, συσχέτιση με το ΣΔΤ2 ταυτοποιήθηκε με ένα SNP στο ιντρόνιο 4, ο rs7903146 που αντικαθιστά την κυτοσίνη με τη θυμίνη (C/T) και το αλληλόμορφο κινδύνου έχει ταυτοποιηθεί ως το «T». Το αλληλόμορφο κινδύνου «T» έχει συσχετιστεί με μειωμένη έκκριση ινσουλίνης, με την επεξεργασία της ινσουλίνης μειώνοντας τη μετατροπή της

προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη και με επίδραση στη δράση της ινκρετίνης. Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη υπεργλυκαιμίας. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι το γονίδιο *TCF7L2* απαιτείται για την ανάπτυξη του παγκρέατος μέσω της ενεργούς σηματοδότησης Wnt και της προστασίας των β κυττάρων. Η *in vitro* καταστολή του γονιδίου *TCF7L2* σε απομονωμένα νησίδια οδήγησε σε μειωμένη επιβίωση και λειτουργία των β κυττάρων. Το γονίδιο *TCF7L2* έχει επίσης θέσεις δέσμησης στον υποκινητή της προγλυκαγόνης και μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση του GLP-1 (Sudchada P. et al., 2014).

Οι φορείς του αλληλομόρφου κινδύνου «T» χαρακτηρίζονται περαιτέρω από αυξημένο επίπεδο προϊνσουλίνης στο πλάσμα και μια αυξημένη αναλογία προϊνσουλίνης προς ινσουλίνη υποδηλώνοντας διαταραγμένη επεξεργασία της προ-ινσουλίνης (Zhou Y. et al., 2014).

Η πλειοψηφία των παραλλαγών που σχετίζονται με τον κίνδυνο για διαβήτη τύπου 2 από μελέτες GWAS φαίνεται να επηρεάζουν τη λειτουργία των παγκρεατικών νησιδίων. Προς στήριξη της επίδρασης του πολυμορφισμού rs7903146 στα παγκρεατικά νησίδια, οι φορείς του «T» αλληλομόρφου κινδύνου εμφανίζουν υψηλότερο βαθμό ανοικτής χρωματίνης στα παγκρεατικά νησίδια, αλλά όχι σε άλλους ιστούς (Zhou Y. et al., 2014). Αυτό δείχθηκε με τον εξής τρόπο: Χρησιμοποιήθηκαν 31 δείγματα ανθρώπινων παγκρεατικών νησιδίων κι από αυτά, τα 9 άτομα ταυτοποιήθηκαν ως ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό rs7903146. Η μελέτη έδειξε ότι στα χρωμοσώματα που φέρουν το «T» αλληλόμορφο, το οποίο έχει συσχετιστεί με ΣΔΤ2, η δομή της χρωματίνης είναι πιο «ανοικτή». Εν συνεχεία, δημιουργήθηκαν αλληλομορφο-ειδικά κατασκευάσματα αναφοράς λουσιφεράσης και μετρήθηκε η δραστηριότητα του ενισχυτή σε δύο παγκρεατικά νησίδια β κυττάρων. Αλληλομορφικές διαφορές στη δραστηριότητα παρατηρήθηκαν και στις δύο κυτταρικές σειρές. Το αλληλόμορφο «T» όμως έδειξε σημαντικά μεγαλύτερη δραστηριότητα ενισχυτή σε σχέση με το αλληλόμορφο «C». Αυτά τα στοιχεία προτείνουν ότι οι παραλλαγές στο γονίδιο *TCF7L2* επηρεάζουν την ευαισθησία σε ΣΔΤ2 μεταβάλλοντας τη *cis* ρύθμιση με τη δομή της χρωματίνης στα νησίδια των παγκρεατικών κυττάρων (Gaulton et al., 2010).

Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *TCF7L2* επηρεάζουν επίσης την απόκριση των ασθενών με ΣΔΤ2 στα φάρμακα για τη θεραπεία της νόσου και είναι ο μόνος

προγνωστικός δείκτης της αποτυχίας της θεραπείας με σουλφονουλορίες. Το «T» αλληλόμορφο κινδύνου στον πολυμορφισμό rs7903146 σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο αποτυχίας της θεραπείας με σουλφονουλορία. Έχει παρατηρηθεί ότι οι ομόζυγοι φορείς των αλληλομόρφων κινδύνου του γονιδίου *TCF7L2* (rs1225372 και rs7903146) είχαν διπλάσιες πιθανότητες να μην ανταποκριθούν στη θεραπεία με σουλφονουλορίες, σε σχέση με τους ασθενείς που ήταν ομόζυγοι για τα κοινά αλληλόμορφα (Huang Q. et al., 2011).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού rs7903146 του γονιδίου *TCF7L2* με την ανταπόκριση των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 στον ελληνικό πληθυσμό, στη θεραπεία με αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1).

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Δείγμα περιφερικού αίματος ελήφθη από 40 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II από το Διαβητολογικό Κέντρο της Α' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ της Θεσσαλονίκης. Τα δείγματα αίματος αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια που περιείχαν το αντιπηκτικό EDTA, για να αποφευχθεί η πήξη τους.

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με τους αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1) αξιολογήθηκε μετά από 6 μήνες θεραπείας, με βάση i) τη μείωση σε ποσοστό $> 0,7\%$ της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης HbA_{1c} και ii) τη μείωση του σωματικού βάρους σε ποσοστό $> 5\%$ ή απώλεια βάρους > 5 kg.

3.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από αίμα

3.1.1. Αρχή της μεθόδου

Για κάθε απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκε 0,3 ml αίματος. Στόχος της μεθόδου είναι η ανάκτηση του DNA, που βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση γενωμικού DNA από το αίμα των ασθενών βασίζεται στη διάρρηξη των μεμβρανών με τη χρήση απορρυπαντικών (SDS), στην επώαση με πρωτεΐνωση K, στις εκχυλίσεις με φαινόλη/χλωροφόρμιο και στην κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Η σύσταση όλων των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στο Παράρτημα που βρίσκεται στη σελίδα 82.

Πρωτόκολλο απομόνωσης:

1. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου, 0,3 ml αίματος τοποθετείται σε αποστειρωμένο tube χωρητικότητας 1,5 ml.
2. Προστίθεται 1ml SSC buffer 1x και ακολουθεί έντονη ανάδευση του μείγματος με Vortex.
3. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min στις 13.000 rpm και το υπερκείμενο απομακρύνεται.
4. Προστίθεται εκ νέου 1 ml SSC buffer 1x, επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση κι απομακρύνεται το υπερκείμενο.
5. Στο ίζημα προστίθενται 300 μl CH₃COONa 0,2M, 50 μl SDS 5% και 10 μl πρωτεϊνάση K (10 mg/ml). Ακολουθεί έντονη ανάδευση του μείγματος με Vortex.
6. Τα δείγματα επωάζονται για 1h στους 55°C με συχνή ανάδευση.
7. Επώαση με 300 μl φαινόλη και 300 μl χλωροφόρμιο. Ακολουθεί ανάδευση με vortex για 5 sec.
8. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στους 4°C για 10 min στις 13.000 rpm.
9. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο tube χωρητικότητας 1,5 ml και ακολούθως προστίθεται 1 ml χλωροφόρμιο. Ακολουθεί ανάδευση με vortex.
10. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στους 4 °C για 5 min στις 13.000 rpm.
11. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο tube 1,5 ml και κατόπιν προστίθεται 1 ml παγωμένης ισοπροπανόλης. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και επώαση στους -20°C για 20 min.
12. Γίνεται κατακρήμνιση με φυγοκέντρηση στους 4°C για 20 min στις 13.000 rpm και ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου.
13. Το ίζημα ξεπλένεται με προσθήκη παγωμένης αιθανόλης 70%. Ακολουθεί ανάδευση.
14. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στους 4°C για 5 min στις 13.000 rpm και απομακρύνεται το υπερκείμενο.

15. Το ίζημα ξηραίνεται για περίπου 30 min στους 37°C, μέχρι να μη γίνεται αντιληπτή η οσμή της αιθανόλης.
16. Το ίζημα επαναδιαλύεται με την προσθήκη 100 μl ddH₂O και ακολουθεί επώαση για 1 h στους 55°C.
17. Αποθήκευση του απομονωμένου DNA στους 4°C για άμεση χρήση ή στους -20°C για μελλοντική χρήση.

3.2 Έλεγχος της απομόνωσης του DNA

Για να ελεγχθεί εάν η απομόνωση του DNA ήταν επιτυχής αλλά και εάν αυτό έχει διατηρήσει την ακεραιότητά του χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο της κίνησης χημικών ενώσεων (κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων) μέσα σε ένα πήκτωμα (gel) με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα νουκλεϊκά οξέα, μετακινούνται από αρνητικά προς θετικά ηλεκτρόδια, λόγω στο φυσικά-φερόμενο αρνητικό τους φορτίο που παρατηρείται στο σκελετό σακχάρου-φωσφορικής ομάδας

Η ταχύτητα με την οποία κινείται το DNA μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται:

- α. Από το μοριακό του μέγεθος. Τα μικρότερα μόρια κινούνται γρηγορότερα γιατί διαπερνούν πιο εύκολα από τους πόρους της πηκτής.
- β. Τη διαμόρφωση του μορίου DNA.
- γ. Τη συγκέντρωση της αγαρόζης.
- δ. Τη διαφορά τάσης του πεδίου ηλεκτροφόρησης.

Το DNA μπορεί να γίνει ορατό με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο όταν παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA μπορεί να φθορίζει στο υπεριώδες φως.

3.2.2 Κατασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Υπολογίζεται η ποσότητα της αγαρόζης με βάση την επιθυμητή τελική συγκέντρωση αγαρόζης του πηκτώματος. Η επιθυμητή τελική συγκέντρωση αγαρόζης είναι 1,5% και συνεπώς για την κατασκευή του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης σύμφωνα με τις διαστάσεις της μήτρας που χρησιμοποιείται για τη στερεοποίηση του πηκτώματος απαιτείται 0,8 gr αγαρόζης και 50 ml TAE.

Προετοιμασία πηκτώματος – δειγμάτων

1. Ζυγίζονται 0,5 gr αγαρόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη μαζί με 50 ml TAE 1x.
2. Γίνεται θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι τη διάλυση της αγαρόζης.
3. Προστίθενται 5 μl βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 1mg/ ml (γενικά 1 μl/10 ml διαλύματος) και το διάλυμα αναδεύεται.
4. Το διάλυμα τοποθετείται στην κατάλληλη μήτρα κι αφήνεται να πήξει για περίπου 20 min.
5. Πραγματοποιείται μεταφορά του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x μέχρι το πήκτωμα να καλυφθεί εντελώς.
6. Χρησιμοποιείται 2 μl από το απομονωμένο DNA (50-100 ng) με 3 μl χρωστικής (loading buffer 6x) και φορτώνονται στα πηγαδάκια του πηκτώματος.
7. Εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση 100 Volt.
8. Πραγματοποιείται έλεγχος του πηκτώματος σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και ακολουθεί φωτογράφησή του.

3.3 Η τεχνική PCR

3.3.1 Αρχή της μεθόδου

Με την τεχνική PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης επιτυγχάνεται η σύνθεση και ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, “*in vitro*”. Σε χρονικό διάστημα λίγων μόνο ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλύσεων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του ‘60.

Η PCR αποτελεί μια κυκλική επανάληψη τριών σταδίων:

Πρώτο στάδιο: Μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο.

Δεύτερο στάδιο: Τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία καλούνται εκκινητές ή “primers” «υβριδίζονται» στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA.

Τρίτο στάδιο: Με τη δράση του ενζύμου *Taq DNA* πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3’ άκρο κάθε εκκινητού (primer) και η αλυσος επεκτείνεται. Έτσι σχηματίζονται δύο καινούργιες αλυσες ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου.

Για την πραγματοποίηση της PCR απαιτούνται:

1. DNA-στόχος: Το μόριο DNA που περιλαμβάνει ή αποτελεί το τμήμα που θέλουμε να ενισχύσουμε.
2. Εκκινητές (primers): Είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 15-30 βάσεων με αλληλουχία συμπληρωματική με τη μία μόνο από τις δύο αλυσίδες DNA.
3. dNTPs: (dATP, dCTP, dGTP, dTTP): Τα dNTPs αποτελούν τα απαραίτητα δομικά συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA στην PCR.

4. Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση: Το ένζυμο *Taq* είναι μια θερμοάντοχη DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργό ακόμη και στους +95°C, θερμοκρασία η οποία απαιτείται για τη μετουσίωση του DNA στόχου.
5. Ιόντα μαγνησίου (Mg²⁺): Η *Taq* DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ιόντα Mg²⁺ ως μεταλλικό συμπράγοντα. Η συγκέντρωση των ιόντων Mg²⁺ έχει μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στη ποσότητα του προϊόντος της PCR. Γενικά, περίσσεια Mg²⁺ θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος, ενώ έλλειψη Mg²⁺ θα μειώσει την ποσότητα του προϊόντος.
6. Ρυθμιστικό διάλυμα: Είναι υδατικά διαλύματα αλάτων και χημικών ουσιών που παρέχουν ένα κατάλληλο χημικό περιβάλλον για την DNA πολυμεράση.

Ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας:

Στην παρούσα εργασία, η τεχνική PCR εφαρμόστηκε για την ενίσχυση του τμήματος του γενετικού τόπου του γονιδίου *TCF7L2*, που περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό rs7903146.

3.3.2 PCR

Το μιξ της PCR προετοιμάζεται πάντα σε πάγο. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι αποστειρωμένα, για την αποφυγή επιμολύνσεων. Ο τελικός όγκος των αντιδράσεων ήταν 25 μl. Οι εκκινητές για την αντίδραση PCR βασίστηκαν σε προηγούμενη μελέτη (Barros C.M.A.R. et al., 2014).

Πίνακας 1: Αλληλουχία εκκινητών του πολυμορφισμού rs7903146.

Γενετικός πολυμορφισμός	Εμπρόσθιος εκκινητής	Ανάστροφος εκκινητής
IVS3 C>T (rs7903146)	5'- ACAATTAGAGAGCTAAGCACTT TTTAGGTA-3'	5'- GTGAAGTGCCCAAGCT TCTC-3'

Πίνακας 2: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε κάθε αντίδραση.

Συστατικά PCR	Ποσότητες (μl)
Buffer 10x +1,5 mM Mg ²⁺	2,5
dNTPs (10 mM)	0,5
Εμπρόσθιος εκκινητής (50 pmol/ml) 5'-ACAATTAGAGAGCTAAGCACTTTT TAGGTA-3'	0,5
Ανάστροφος εκκινητής (50 pmol/ml) 5'-GTGAAGTGCCCAAGCTTCTC-3'	0,5
MgCl ₂ (25 mM)	-
Taq DNA πολυμεράση (5U/μl)	0,1
ddH ₂ O	19,9
DNA μήτρα	1 (50-100 ng)

Πίνακας 3: Οι συνθήκες της PCR.

Στάδια	IVS3 C>T (rs7903146)	
	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	5 min
Αποδιάταξη	94°C	30 sec
Υβριδοποίηση	58°C	30 sec
Επέκταση	72°C	30 sec
Τελική επέκταση	72°C	5 min

3.3.3 Ανίχνευση προϊόντων PCR

Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5 %. Για το συγκεκριμένο γενετικό πολυμορφισμό χρησιμοποιείται 5 (από τα 25) μl προϊόντος PCR από κάθε δείγμα, τα οποία αναμειγνύονται με 3 μl διαλύματος χρωστικής (6x loading buffer). Το προϊόν PCR που προκύπτει είναι 188 bp.

3.4 Γονοτύπηση με RFLP

Η γονοτύπηση του πολυμορφισμού rs7903146 του γονιδίου *TCF7L2* πραγματοποιήθηκε με RFLP (Restriction fragment length polymorphism), όπως σε προηγούμενη μελέτη (Barros C.M.A.R. et al., 2014). Ειδικότερα, μετά την ενίσχυση, στα προϊόντα PCR, τα οποία έχουν μέγεθος 188 bp, γίνεται πέψη με το ένζυμο περιορισμού *RsaI* (NEB, USA) στους 37° C για 4 h. Το ένζυμο *RsaI* αναγνωρίζει και κόβει στη θέση 5'-GT ▼ AC-3' του αλληλομόρφου «C» και παράγει δύο θραύσματα, ένα με μέγεθος 159 bp και ένα με μέγεθος 29 bp, ενώ το αλληλόμορφο «T» (σπάνιο) δεν τεμαχίζεται και το προϊόν της PCR παραμένει στο αρχικό μέγεθος (188 bp).

3.5 Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση συσχέτισης του πολυμορφισμού rs7903146 του γονιδίου *TCF7L2* με την ανταπόκριση στη θεραπεία, οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες και ομαδοποιήθηκαν σε ομόζυγους και ετερόζυγους για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό. Για τη δοκιμή ισορροπίας Hardy-Weinberg χρησιμοποιήθηκε το τεστ χ^2 . Οι ομάδες των ασθενών με θετική ή αρνητική ανταπόκριση, στους 6 μήνες θεραπείας για κάθε φάρμακο ξεχωριστά, μελετήθηκαν μη παραμετρικά, χρησιμοποιώντας 2 x 2 πίνακες συνάφειας. Ο πολυμορφισμός, ο οποίος πέρασε τα κριτήρια της ισορροπίας Hardy-Weinberg, μελετήθηκε για συσχέτιση με την ανταπόκριση στην θεραπεία, χρησιμοποιώντας το Cochran-Armitage trend τεστ καθώς και άλλα τεστ τα οποία βασίζονται σε υπολειπόμενη ή επικρατή δράση του κοινού αλληλομόρφου. Οι ομάδες γονοτύπων μελετήθηκαν με το Fisher's exact τεστ και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $P \leq 0,05$. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρησιμοποίηση του στατιστικού προγράμματος SPSS 14 (Inc, Chicago, IL, USA).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΣΔΤ2

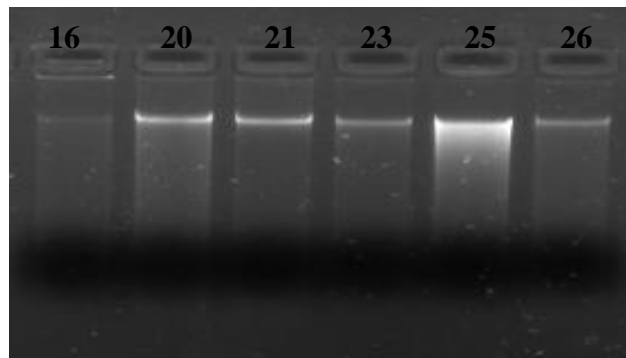
Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 που μελετήθηκαν για τον πολυμορφισμό rs7903146 φαίνονται στον Πίνακα 4. Ο συνολικός αριθμός των ασθενών ήταν 40 (n=40). Από τα άτομα που συμμετείχαν 20 ήταν άντρες και 20 γυναίκες, επιβεβαιώνοντας την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια συχνότητα. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 68,9 έτη, η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου ήταν τα 51,4 έτη και η μέση διάρκεια της τα 17,4 έτη. Επιπλέον, το μέσο σωματικό βάρος των ασθενών ήταν 92,1 kg και η μέση τιμή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης HbA1c ήταν 6,6. Το 80% των ασθενών ανταποκρίθηκε στη θεραπεία, ενώ το 20% των ασθενών δεν ανταποκρίθηκε.

Πίνακας 4: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (n=40).

Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέση τιμή \pm SD	69,2 \pm 8,4
Φύλο Α/Θ	20/20
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέση τιμή \pm SD	17 \pm 8,3
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέση τιμή \pm SD	52,2 \pm 8,2
Σωματικό βάρος ασθενών (Kg) \pm SD	92,1 \pm 17,1
Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη HbA1c \pm SD	6,6 \pm 0,6
Ποσοστό ανταποκριθέντων ασθενών	80%
Ποσοστό μη ανταποκριθέντων ασθενών	20%

4.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος

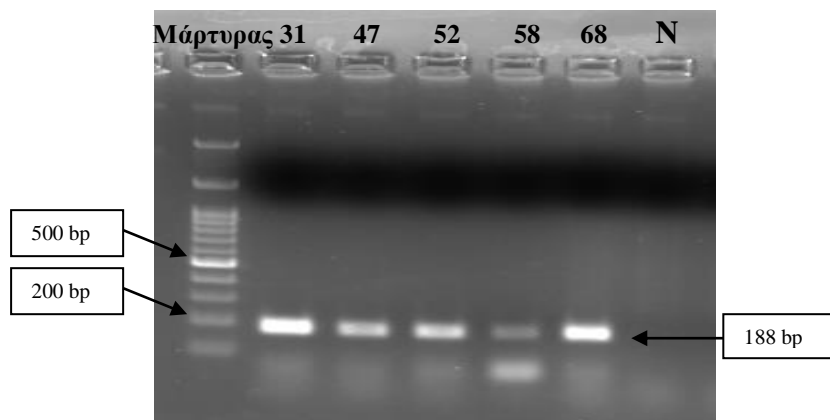
Ο έλεγχος της ποιότητας του γενωμικού DNA που απομονώθηκε από τους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 από κύτταρα του περιφερικού αίματος έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. Από την ηλεκτροφόρηση προκύπτει η Εικόνα 16, στην οποία φαίνεται η ακεραιότητα και η ποιότητα του γενωμικού DNA.



Εικόνα 16: Έλεγχος αποτελέσματος απομόνωσης γενετικού υλικού σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. (Οι αριθμοί 16, 20, 21, 23, 25, και 26 αποτελούν την κωδική ονομασία των ασθενών και αναφέρονται στον Πίνακα 5).

4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Το τμήμα του γονιδίου *TCF7L2* που περιέχει τον πολυμορφισμό rs7903146 ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR. Στην Εικόνα 17 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR.

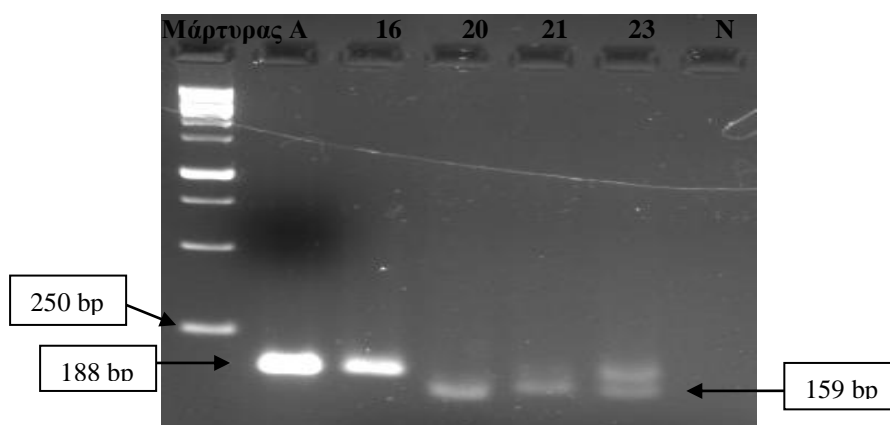


Εικόνα 17: Έλεγχος του προϊόντος PCR του τμήματος του γονιδίου *TCF7L2* που περιέχει τον πολυμορφισμό rs7903146 σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Το προϊόν της PCR έχει μήκος 188bp. Φαίνεται ο μάρτυρας (δείκτης μοριακού βάρους μεγέθους 100bp), ο αρνητικός μάρτυρας (N), και τα προϊόντα PCR. (Οι αριθμοί 31, 47, 52, 58 και 68 αποτελούν την κωδική ονομασία των ασθενών και αναφέρονται στον Πίνακα 5).

4.4 Γονοτύπηση

Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με το ένζυμο RsaI που αναγνωρίζει και κόβει στη θέση 5'-GT ▼ AC-3' του αλληλομόρφου C του πολυμορφισμού rs7903146 του γονιδίου *TCF7L2* και παράγει δύο θραύσματα, ένα με μέγεθος 159 bp και ένα με μέγεθος 29 bp, ενώ το αλληλόμορφο «T» (σπάνιο) δεν τεμαχίζεται και το προϊόν της PCR παραμένει στο αρχικό μέγεθος (188 bp).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης. Στην Εικόνα 18 απεικονίζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων πέψης.



Εικόνα 18: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων πέψης. Φαίνεται ο μάρτυρας (δείκτης μοριακού βάρους μεγέθους 100bp), το άκοπο προϊόν της PCR μήκους 188 bp (A), άτομο ομόζυγο T/T (16), άτομα ομόζυγα C/C για το κοινό αλληλόμορφο C (20, 21), άτομο ετερόζυγο C/T (23) και ο αρνητικός μάρτυρας (N). (Οι αριθμοί 16, 20, 21 και 23 αποτελούν την κωδική ονομασία των ασθενών και αναφέρονται στον Πίνακα 5).

Στον Πίνακα 5 φαίνεται η κωδική ονομασία κάθε ασθενή καθώς και ο αντίστοιχος γονότυπος για τον πολυμορφισμό rs7903146 του γονιδίου *TCF7L2*.

Πίνακας 5: Οι γονότυποι των ασθενών με διαβήτη που έλαβαν θεραπεία με αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1).

ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΣΘΕΝΗ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ
16	T/T
20	C/C
21	C/C
23	C/T
25	C/T
26	C/T
31	C/C
32	T/T
33	C/T
34	T/T
36	C/C
37	C/T
39	C/C
40	C/T
43	C/T
44	C/T
45	T/T
47	C/T
50	C/T
51	C/C
52	C/T
58	C/T
59	C/C
60	C/T
62	C/C
64	C/C
65	T/T
68	T/T
70	C/C
71	C/C
80	C/C
81	C/T
82	C/C
90	C/T
96	C/T
102	C/T
103	C/T
109	C/T
128	T/T
129	T/T

4.5 Στατιστική ανάλυση

Η συσχέτιση γονοτύπου των ασθενών και της συχνότητας των αλληλομόρφων με την ανταπόκριση στη θεραπεία με αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1) μετά από 6 μήνες θεραπείας φαίνεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Συσχέτιση ανάμεσα στο γονότυπο των ασθενών και την ανταπόκριση στη θεραπεία με τους αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1), εξενατίδη, λιραγλουτίδη και λιξιसेνατίδη (n=40).

Πολυμορφισμός του γονιδίου <i>TCF7L2</i>	Τεστ	Ανταποκριθέντες ασθενείς	Μη ανταποκριθέντες ασθενείς	P value
IVS3 C>T (rs7903146)	Γενότυποι [CC/CT/TT]	12/15/5	1/5/2	0,44
	Cochran-Armitage [C/T]	39/25 (0,61)	7/9 (0,44)	0,26
	Επικρατής δράση [(CC+CT)/TT]	27/5	6/2	0,61
	Υπολειπόμενη δράση [CC/(CT+TT)]	12/20	1/7	0,23

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της γονοτύπησης για όλους τους ασθενείς διαμορφώθηκε ο Πίνακας 6, στον οποίο το σύνολο των ασθενών που έλαβαν μέρος στην μελέτη, χωρίστηκαν σε ανταποκριθέντες (80%) και μη-ανταποκριθέντες (20%)

στη θεραπεία με τους αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1). Όσον αφορά τους ανταποκριθέντες ασθενείς, η γονοτύπηση έδειξε ότι 12 από αυτούς ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο «C», 5 ομόζυγοι για το αλληλόμορφο «T» και 15 ετερόζυγοι. Η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου «C» στους ανταποκριθέντες είναι 0,61. Όσον αφορά τους μη-ανταποκριθέντες, η γονοτύπηση έδειξε ότι μόνο ένας από αυτούς ήταν ομόζυγος για το αλληλόμορφο «C», 2 ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο «T» και 5 ετερόζυγοι. Η συχνότητα του αλληλομόρφου «C» στους μη-ανταποκριθέντες υπολογίστηκε στο 0,44. Το αλληλόμορφο «C» εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα στους ανταποκριθέντες ασθενείς σε σχέση με αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. Η στατιστική ανάλυση των συχνοτήτων των δύο ομάδων με το τεστ Cochran-Armitage έδειξε μη στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($P=0,26$), ως προς τη συσχέτιση του αλληλομόρφου «T» με την ανταπόκριση στη θεραπεία με τους αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1).

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος βάσει της υπόθεσης επικρατούς ή υπολειπόμενης δράσης του αλληλομόρφου «C», ο οποίος επίσης έδειξε μη στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα τόσο για την επικρατή όσο και για την υπολειπόμενη δράση του συγκεκριμένου αλληλομόρφου ($P=0,61$).

Συμπερασματικά, σύμφωνα με την ανάλυση για το σύνολο των ασθενών, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs7903146 με την απόκριση στη θεραπεία.

Λόγω της αύξησης που παρατηρείται στη συχνότητα του αλληλομόρφου «T» στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει φαρμάκου. Οι Πίνακες 7, 8 και 9 που απεικονίζουν τη συσχέτιση του γονοτύπου των ασθενών και της συχνότητας των αλληλομόρφων με την ανταπόκριση στη θεραπεία με εξενατίδη, λιραγλουτίδη και λιξισενατίδη αντίστοιχα, μετά από 6 μήνες θεραπείας, παρατίθενται παρακάτω.

Πίνακας 7: Συσχέτιση ανάμεσα στο γονότυπο των ασθενών και την ανταπόκριση στη θεραπεία με εξενατίδη (n=14).

Πολυμορφισμός του γονιδίου <i>TCF7L2</i>	Τεστ	Ανταποκριθέντες ασθενείς	Μη ανταποκριθέντες ασθενείς	P value
IVS3 C>T (rs7903146)	Γενότυποι [CC/CT/TT]	4/6/3	1/0/0	0,57
	Cochran-Armitage [C/T]	14/12 (0,53)	2/0 (1,0)	1
	Επικρατής δράση [(CC+CT)/TT]	10/3	1/0	1
	Υπολειπόμενη δράση [CC/(CT+TT)]	4/9	1/0	0,36

Στον Πίνακα 7 παρατίθενται τα αποτελέσματα για την ομάδα ασθενών που έλαβαν θεραπεία με εξενατίδη. Από τους 14 ασθενείς που έλαβαν το φάρμακο αυτό, 13 άτομα ανταποκρίθηκαν ενώ ένας δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία. Από τους ανταποκριθέντες ασθενείς, οι 4 ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο «C», οι 3 ομόζυγοι για το αλληλόμορφο «T» και οι 6 ήταν ετερόζυγοι, ενώ από τους μη ανταποκριθέντες ένας ήταν ομόζυγος για το αλληλόμορφο «C», κανένας δεν ήταν ομόζυγος για το αλληλόμορφο «T» και κανένας δεν ήταν ετερόζυγος. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (P=1).

Πίνακας 8: Συσχέτιση ανάμεσα στο γονότυπο των ασθενών και την ανταπόκριση στη θεραπεία με λιραγλουτίδη (n=22).

Πολυμορφισμός του γονιδίου <i>TCF7L2</i>	Τεστ	Ανταποκριθέντες ασθενείς	Μη ανταποκριθέντες ασθενείς	P value
IVS3 C>T (rs7903146)	Γενότυποι [CC/CT/TT]	6/8/2	0/3/3	0,09
	Cochran-Armitage [C/T]	20/12 (0,62)	3/9 (0,25)	0,042
	Επικρατής δράση [(CC+CT)/TT]	14/2	3/3	0,1
	Υπολειπόμενη δράση [CC/(CT+TT)]	6/10	0/6	0,13

Η ανάλυση των δεδομένων για την ομάδα ασθενών που έλαβε θεραπεία με λιραγλουτίδη έδειξε οριακή στατιστική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs7903146 με την ανταπόκριση των ασθενών στο φάρμακο αυτό. Όπως αποτυπώνεται στον Πίνακα 8, από τους 22 ασθενείς που έλαβαν το φάρμακο αυτό ανταποκρίθηκαν οι 16, ενώ 6 δεν ανταποκρίθηκαν. Από τους ανταποκριθέντες ασθενείς, οι 6 ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο «C», οι 2 ομόζυγοι για το αλληλόμορφο «T» και οι 8 ήταν ετερόζυγοι, ενώ από τους μη-ανταποκριθέντες, κανένας δεν ήταν ομοζυγος για το «C», 3 ήταν ομόζυγοι για το «T» και 3 ήταν ετερόζυγοι.

Όσον αφορά τις αλληλομορφικές συχνότητες, η στατιστική ανάλυση των συχνοτήτων μεταξύ ανταποκριθέντων και μη ανταποκριθέντων με το τεστ Cochran-Armitage, έδειξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (P=0,042), ως προς τη

συσχέτιση του αλληλομόρφου «T» με την ανταπόκριση στη θεραπεία με τη λιραγλουτίδη.

Επιπλέον, ο κίνδυνος μη ανταπόκρισης ενός ασθενή, που φέρει το αλληλόμορφο «T», στη θεραπεία με ανάλογα ινκρετινών υπολογίστηκε ως Odds Ratio=5,0 (C.I. 95%: 0,948-29,474). Η δοκιμή για την επικρατή δράση του αλληλομόρφου «C» δε δίνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($P=0,1$).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός rs7903146 του γονιδίου *TCF7L2* εμφανίζει οριακά σημαντική συσχέτιση με την ανταπόκριση στη θεραπεία με λιραγλουτίδη. Σαφώς, αυτό θα πρέπει να επιβεβαιωθεί και σε μεγαλύτερο και πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα.

Πίνακας 9: Συσχέτιση ανάμεσα στο γονότυπο των ασθενών και την ανταπόκριση στη θεραπεία με λιξισενατίδη (n=4).

Πολυμορφισμός του γονιδίου <i>TCF7L2</i>	Τεστ	Ανταποκριθέντες ασθενείς	Μη ανταποκριθέντες ασθενείς	P value
IVS3 C>T (rs7903146)	Γενότυποι [CC/CT/TT]	2/1/0	0/1/0	1
	Cochran-Armitage [C/T]	5/1 (0,83)	1/1 (1)	0,46
	Επικρατής δράση [(CC+CT)/TT]	3/0	1/0	1
	Υπολειπόμενη δράση [CC/(CT+TT)]	2/1	0/1	1

Στον Πίνακα 9 παρατίθενται τα αποτελέσματα για την ομάδα ασθενών που έλαβαν θεραπεία με λιξισενατίδη. Από τους 4 ασθενείς, 3 άτομα ανταποκρίθηκαν ενώ 1 δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία. Σύμφωνα με τον Πίνακα 9, από τους ανταποκριθέντες ασθενείς, οι 2 ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο «C», κανένας δεν ήταν ομόζυγος για το αλληλόμορφο «T» και ένας ήταν ετερόζυγος, ενώ από τους μη ανταποκριθέντες κανένας δεν ήταν ομόζυγος για το αλληλόμορφο «C», ή το «T» και ένας ήταν ετερόζυγος. Η ανάλυση δεν έδειξε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (P=1).

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μία από τις παλαιότερες ασθένειες που γνωρίζει ο άνθρωπος (Ahmed A.M., 2002). Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες ο αριθμός των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη έχει υπερδιπλασιαστεί σε παγκόσμιο επίπεδο, καθιστώντας τον μία από τις πιο σημαντικές προκλήσεις για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως (Chen L. et al., 2011), γεγονός που συνεπάγεται ένα μεγάλο οικονομικό κόστος. Με την πρόβλεψη της κατάλληλης θεραπείας για τον κάθε ασθενή, μέσω της φαρμακογενετικής, προκύπτει ένα μεγάλο οικονομικό όφελος, λόγω της αποφυγής επιπλέον ιατρικών υπηρεσιών για την αντιμετώπιση των συνεπειών των παρενεργειών ή της έλλειψης αποτελεσματικότητας ορισμένων φαρμάκων.

Η φαρμακογενετική έχει στόχο την υλοποίηση της «εξατομικευμένης θεραπείας» για τον καθορισμό των φαρμάκων και της δοσολογία τους, για τη μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας της νόσου και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών με ΣΔΤ2 (Liu Z.- Q. et al., 2011). Ο διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2) είναι μια κοινή μεταβολική διαταραχή που έχει μια ισχυρή γενετική συνιστώσα και δημιουργείται από το συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (Kaur T. et al., 2010). Η παρατήρηση ότι οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 παρουσιάζουν μεγάλη μεταβλητότητα στην ανταπόκριση στην ίδια φαρμακευτική αγωγή υποδεικνύει τη σημασία της εξατομικευμένης προσέγγισης, κατά την οποία η κατάλληλη θεραπεία εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο του κάθε ατόμου (Brunetti A. et al., 2014).

Πολλές κατηγορίες αντιδιαβητικών φαρμάκων διατίθενται σήμερα για τη θεραπεία ασθενών με διαβήτη τύπου 2, με τις σουλφονουλουρίες (SU), τα διγουανίδια, τις θειαζολιδινοδιόνες (TZDs) και τις μεγλιτινίδες να είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα (Semiz S. et al., 2013). Επίσης, τα ανάλογα των ινκρετινών ή αλλιώς αγωνιστών του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1), όπως τα φάρμακα εξενατίδη, λιραγλουτίδη και λιξιसेνατίδη, έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται πλέον ως νέοι θεραπευτικοί παράγοντες στο ΣΔΤ2. Αυτά είναι πεπτίδια που χορηγούνται με υποδόρια ένεση (όπως η ινσουλίνη) κι έχουν πολύ μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από το φυσικό GLP-1.

Ο μεταγραφικός παράγοντας *TCF7L2* ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση του προγλυκογόνου κι έτσι την παραγωγή του GLP-1, μια γαστρεντερική ορμόνη του εντέρου που προκαλεί την έκκριση ινσουλίνης σε απόκριση στην πρόσληψη τροφής (Omar A., 2013; DeFronzo R. A. et al., 2015; McCarthy MI, 2010). Η ισχυρότερη συσχέτιση με το ΣΔΤ2 ταυτοποιήθηκε με το SNP rs7903146 (C/T) στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *TCF7L2* και το αλληλόμορφο κινδύνου έχει ταυτοποιηθεί ως το «Τ» (Sudchada P. et al., 2014).

Η παρούσα πιλοτική μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs7903146 του γονιδίου *TCF7L2*, με την ανταπόκριση των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 στη θεραπεία με τους αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1) εξενατίδη, λιραγλουτίδη και λιξιसेνατίδη. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκαν 40 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 με στόχο να διερευνηθεί αν ο πολυμορφισμός rs7903146 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία με τα ανάλογα των ινκρετινών.

Βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του συγκεκριμένου πολυμορφισμού και της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στην παρούσα εργασία μελετήθηκε μικρός αριθμός διαβητικών ασθενών και κυρίως ακόμη μικρότερος αριθμός ασθενών που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με τα τρία αυτά ανάλογα των ινκρετινών. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της πιλοτικής αυτής μελέτης θα πρέπει να ερμηνευτούν με προσοχή, καθώς απαιτείται επιβεβαίωση σε μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών, η σύσταση του οποίου θα πρέπει να αντιστοιχεί στην καθημερινή κλινική πράξη.

Παρά τη μη στατιστικά σημαντική συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού και της ανταπόκρισης των ασθενών συνολικά στη θεραπεία παρατηρήθηκε ότι υπάρχει τάση για συσχέτιση του σπάνιου αλληλομόρφου «Τ» με την απόκριση των διαβητικών ασθενών στα φάρμακα αυτά, καθώς η συχνότητα του αυξανόταν στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη συγκεκριμένη θεραπεία (0,39 σε 0,51). Η κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει φαρμάκου έδειξε οριακή στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs7903146 με μη ανταπόκριση των ασθενών που έλαβαν λιραγλουτίδη, με τους φορείς του «Τ» αλληλομόρφου να

έχουν πέντε φορές σχετικό κίνδυνο να μην ανταποκριθούν στη θεραπεία με λιραγλουτίδη [$P=0,042$; OR 5,0 (95% CI: 0,95-29,48)]. Η κατηγοριοποίηση δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα άλλα δυο ανάλογα των ινκρετινών. Πρόσφατες μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι το αλληλόμορφο «T» έχει συσχετιστεί με τη μειωμένη έκκριση ινσουλίνης, με την επεξεργασία της ινσουλίνης μειώνοντας τη μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη και με την επίδραση στη δράση της ινκρετίνης GLP-1. Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη υπεργλυκαιμίας (Sudchada P. et al., 2014).

Συνεπώς, με την αύξηση του πληθυσμού των ασθενών είναι πιθανόν να παρατηρηθεί σημαντικότερη συσχέτιση. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *TCF7L2* επηρεάζουν επίσης την απόκριση των ασθενών με ΣΔΤ2 σε άλλα φάρμακα για τη θεραπεία της νόσου. Το αλληλόμορφο κινδύνου «T» στον πολυμορφισμό rs7903146 σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο αποτυχίας της θεραπείας με σουλφονουλουρία. Σε *in vitro* μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι οι ομόζυγοι φορείς των αλληλομόρφων κινδύνου του γονιδίου *TCF7L2* (rs1225372 και rs7903146) είχαν διπλάσιες πιθανότητες να μην ανταποκριθούν στη θεραπεία με σουλφονουλουρίες, σε σχέση με τους ασθενείς που ήταν ομόζυγοι για τα κοινά αλληλόμορφα (Huang Q. et al., 2011).

Με βάση τις μελέτες στις οποίες συνθετικό GLP-1 ή αγωνιστές του υποδοχέα του παρόμοιου με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 (GLP-1), χορηγούνται σε ανθρώπους έχει αποδειχθεί ότι το GLP-1 έχει πολλές δράσεις που προάγουν την ομοίωση της γλυκόζης, συμπεριλαμβανομένης της διέγερσης έκκρισης ινσουλίνης, την καταστολή της απελευθέρωσης γλυκαγόνης (Schirra J. et al., 2006), την καθυστέρηση της γαστρικής κένωσης, και την αύξηση της ηπατικής ισορροπία της γλυκόζης (Salehi M. et al., 2010). Συνεπώς, η εύρεση και η μελέτη περισσότερων πολυμορφισμών που να επηρεάζουν λειτουργικά τον υποδοχέα GLP-1R, καθώς και το μονοπάτι ενεργοποίησης του GLP-1 μπορεί να αποτελέσει στόχο για τη μελέτη προγνωστικών δεικτών για τη θεραπεία με ανάλογα ινκρετινών στο ΣΔΤ2.

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ahlqvist E., Groop L. (2015). The genetics of type 2 diabetes In R. A. DeFronzo., E. Ferrannini, P. Zimmet, K.G. Alberti M.M. (2015), International Textbook of Diabetes Mellitus - Fourth Edition 2015 (pp. 1-16). UK: JohnWiley & Sons, Ltd.
2. Ahmed A.M. (2002). History of diabetes mellitus. Saudi Med J. 23(4):373-378.
3. Astrup A., Carraro R., Finer N., Harper A., Kunesova M., Lean M.E.J., L Niskanen, Rasmussen M.F., Rissanen A., Rossner S., Savolainen M.J., Van Gaal L. (2012). Safety, tolerability and sustained weight loss over 2 years with the once-daily human GLP-1 analog, Liraglutide. International Journal of Obesity 36, 843–854.
4. Avramopoulos I., Moulis A., Nikas N. (2015). Glycaemic control, treatment satisfaction and quality of life in type 2 diabetes patients in Greece: The PANORAMA study Greek results. World J Diabetes 6(1): 208-216.
5. Azevedo M., Alla S. (2008). Diabetes in sub-saharan Africa: kenya, mali, mozambique, Nigeria, South Africa and zambia. Int J Diabetes Dev Ctries 28(4):101-108.
6. Bacquer O. L., Shu L., Marchand M., Neve B., Paroni F., Conte J. K., Pattou F., Froguel P., Maedler K. (2011). TCF7L2 splice variants have distinct effects on b-cell turnover and function Human Molecular Genetics, Vol. 20, No. 10 1906–1915.
7. Baggio L. L., Drucker D. J. (2007). Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. GASTROENTEROLOGY Vol. 132, No. 6.
8. Bansal N. (2015). Prediabetes diagnosis and treatment: A review. World J Diabetes 15; 6(2): 296-303.
9. Barnett A. H. (2011). Lixisenatide: evidence for its potential use in the treatment of type 2 diabetes. Review Article. Core Evidence 2011:6 67–79.
10. Barnett A. H. (2012). The role of GLP-1 mimetics and basal insulin analogues in type 2 diabetes mellitus: guidance from studies of liraglutide. Diabetes, Obesity and Metabolism 14: 304–314.
11. Barros C.M.A.R., Araujo-Neto A.P., Lopes T.R., Barros M.A.L., Motta F.J.N., Canalle R., Nunes L.C.C., Rey J.A., Burbano R.R., Lima-Barros M.A.,

- Yoshioka F.K.N., Pinto G.R. (2014). Association of the rs7903146 and rs12255372 polymorphisms in the *TCF7L2* gene with type 2 diabetes in a population from northeastern Brazil *Genetics and Molecular Research* 13 (3): 7889-7898.
12. Billings L.K., Florez J.C. (2010). The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1212:59–77.
 13. Bomba M., Ciavardelli D., Silvestri E., Canzoniero L.M.T., Lattanzio R., Chiappini P., Piantelli M., Di Ilio C., Consoli A. Sensi S.L. (2013). Exenatide promotes cognitive enhancement and positive brain metabolic changes in PS1-KI mice but has no effects in 3xTg-AD animals. *Cell Death and Disease* 4, e612; doi:10.1038/cddis.2013.139.
 14. Brunetti A., Brunetti F. S., Chiefari E. (2014). Pharmacogenetics of type 2 diabetes mellitus: An example of success in clinical and translational medicine. *World J Transl Med* 3(3): 141-149.
 15. Chen L., Magliano D.J., Zimmet P.Z. (2011). The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus: present and future perspectives. *Nature reviews endocrinology*.
 16. Chia C. W., Egan J. M. (2008). Incretin-Based Therapies in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 93(10): 3703–3716.
 17. Cho K., Chung J. Y., Cho S. K., Shin H.-W., Jang I.-J., Park J.-W., Yu K.-S., Cho J.-Y. (2015). Antihyperglycemic mechanism of metformin occurs via the AMPK/LXRα/POMC pathway. *Sci. Rep.* 5, 8145.
 18. Cox E.M., Elelman D. (2009). Test for screening and diagnosis of type 2 diabetes. *Clin Diabetes* 4(27):132-138.
 19. Davidson J. A., Parente E. B., Gross. J. L. (2008). Incretin Mimetics and Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors: Innovative Treatment Therapies for Type 2 Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 52/6:1039-1049.
 20. DeFronzo R. A. (2015). Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intoleranc. In R. A. DeFronzo., E. Ferrannini, P. Zimmet, K.G. Alberti M.M. (2015), *International Textbook of Diabetes Mellitus - Fourth Edition 2015* (pp. 1-16). UK: JohnWiley & Sons, Ltd.
 21. DeFronzo R. A. (2015). Incretin-based therapies. In R. A. DeFronzo., E. Ferrannini, P. Zimmet, K.G. Alberti M.M. (2015), *International Textbook of*

- Diabetes Mellitus - Fourth Edition 2015 (pp. 726-744). UK: JohnWiley & Sons, Ltd.
22. DeFronzo R. A. (2015). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. In R. A. DeFronzo., E. Ferrannini, P. Zimmet, K.G. Alberti M.M. (2015), International Textbook of Diabetes Mellitus - Fourth Edition 2015 (pp. 364-400). UK: JohnWiley & Sons, Ltd.
 23. DeFronzo R. A. (2015). The genetics of type 2 diabetes. In R. A. DeFronzo., E. Ferrannini, P. Zimmet, K.G. Alberti M.M. (2015), International Textbook of Diabetes Mellitus - Fourth Edition 2015 (pp. 401-412). UK: JohnWiley & Sons, Ltd.
 24. Drucker D. J., Nauck M. A. (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368: 1696–705.
 25. Drucker D.J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 3: 153–65.
 26. Drucker D.J., Philippe J., Mojsov S., Chick W.L., Habener J.F.. (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3434–38.
 27. Emami-Riedmaier A., Schaeffeler E., Nies A. T., Morike K., Schwab M. (2015). Stratified medicine for the use of antidiabetic medication in treatment of type II diabetes and cancer: where do we go from here? Review Article. *Journal of Internal Medicine* 277; 235–247.
 28. Evans W. E., McLeod H. L., (2003). Review Article. Pharmacogenomics- Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects *The new england journal of medicine* 348;6.
 29. Gaulton K.J., Nammo T., Pasquali L., Simon J.M. Giresi P.G., Fogarty M.P., Panhuis T.M., Mieczkowski P., Secchi A., Bosco D., Berney T., Montanya E., Mohlke K.L., Lieb J.D., Ferrer J. (2010). A map of open chromatin in human pancreatic islets. *Nat.Genet.* 42: 255-259.
 30. Gurwitz D., Lunshof J.E., Dedoussis G., Flordellis C.S., Fuhr U., Kirchheiner J., Licinio J., Llerena A., Manolopoulos V.G., Sheffield L.J., Siest G., Torricelli F., Vasiliou V., Wong S. (2005). Pharmacogenomics Education: International Society of Pharmacogenomics Recommendations for Medical,

- Pharmaceutical, and Health Schools Deans of Education. *The Pharmacogenomics Journal* 5, 221–225.
31. Holst J.J. (2013). Incretin hormones and the satiation signal. Review. *International Journal of Obesity* 37, 1161–1168.
 32. Hu F.B., Manson J.E., Stampfer M.J., Colditz G., Liu S., Solomon C.G., Willett W. C., (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med.* 345(11):790-797.
 33. Hu F.B., Sigal R.J., Rich-Edwards J.W., Colditz G. A, Solomon C. G., Willett W. C., Speizer F. E., Manson J. E. (1999). Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women: a prospective study. *JAMA* 282(15):1433–1439.
 34. Huangand C., Florez J. C. (2011). Pharmacogenetics in type 2 diabetes: potential implications for clinical practice. *Genome Medicine* 3:76.
 35. Kaur T., Bishnoi D., Badaruddoza (2010). Effect of sex on prevalence of type 2 diabetes mellitus(T2DM) with respect to blood pressure, BMI and WHR among Punjabi population. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* Vol. 2(9), pp. 263-270.
 36. Kimple M. E., Neuman J. C., Linnemann A. K., Casey P. J. (2014). Inhibitory G proteins and their receptors: emerging therapeutic targets for obesity and diabetes. Review. *Experimental & Molecular Medicine* 46, e102; doi:10.1038/emm.
 37. Kwak S. H., Park K. S. (2013). Genetics of type 2 diabetes and potential clinical implications. *Arch. Pharm. Res.* 36:167–177.
 38. Ladenheim E. E. (2015). Liraglutide and obesity: a review of the data so far. *Drug Design, Development and Therapy* 9 1867–1875.
 39. Lean M.E.J., Carraro R., Finer N., Hartvig H., Lindegaard M.L., Rossner S., Van Gaal L., Astrup A. (2014). Tolerability of nausea and vomiting and associations with weight loss in a randomized trial of liraglutide in obese, non-diabetic adults Investigators8*International Journal of Obesity* 38, 689–697.
 40. Liu Z.- Q., Zheng Y. (2011). Pharmacogenetics For diabetes Mellitus. *Internal Med:* 1:1.
 41. Magliano D J., Zimmet P, Shaw J E. (2015). Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance In R. A. DeFronzo., E. Ferrannini, P. Zimmet, K.G. Alberti M.M. (2015), *International Textbook of*

- Diabetes Mellitus - Fourth Edition 2015 (pp. 1-16). UK: JohnWiley & Sons, Ltd.
42. Malecki M.T., Klupa T. (2005). Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. *Pharmacol Rep.* 57 Suppl: 20-32.
 43. Mc Carthy M.I. (2010). Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N Engl J Med.* 363(24):2339-2350.
 44. Meigs J.B., Shrader P., Sullivan L.M., McAteer J.B., Fox C.S., Dupuis J., Manning A.K., Florez J.C., Wilson P.W., D'Agostino R.B. Sr, Cupples L.A. (2008). Genotype score in addition to common risk factors for prediction of type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* 359:2208–2219.
 45. Migdalis I., Rombopoulos G., Hatzikou M., Manes C., Kypraios N., Tentolouris N. (2015). The Cost of Managing Type 2 Diabetes Mellitus in Greece: A Retrospective Analysis of 10-Year Patient Level Data “The HERCULES Study” *International Journal of Endocrinology.*
 46. Nauck M.A., Heimesaat M.M., Orskov C., Holst J.J., Ebert R., Creutzfeldt W. (1993). Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 91: 301–07.
 47. Olokoba A.B., Obateru O.A., Olokoba L.B. (2012). Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Med J.* 27(4):269-273.
 48. Omar A. (2013). Genetics of type 2 diabetes. *World J Diabetes* 15 4(4): 114-123.
 49. Panagiotakos D. B., Pitsavos C., Chrysohoou C. and Stefanadis C. (2005). The epidemiology of Type 2 diabetes mellitus in Greek adults: the ATTICA study. *Diabetic Medicine* 22, 1581–1588.
 50. Pollastro C., Ziviello C., Costa V., Ciccodicola A. (2015). Pharmacogenomics of Drug Response in Type 2 Diabetes: Toward the Definition of Tailored Therapies? Review Article. Hindawi Publishing Corporation, PPAR Research Volume 2015, Article ID 415149, 10 pages.
 51. Qiong Huang and Zhao-qian Liu (2011). Pharmacogenetics for T2DM and Anti-Diabetic Drugs, Recent Advances in the Pathogenesis, Prevention and Management of Type 2 Diabetes and its Complications, Prof. Mark Zimering (Ed.), ISBN: 978-953-307-597-6.

52. Sade'e W., Dai Z. (2005). Pharmacogenetics/genomics and personalized medicine *Human Molecular Genetics*, Vol. 14, Review Issue 2.
53. Salehi M., Aulinger B., Prigeon R. L., D'Alessio D. A. (2010). Effect of Endogenous GLP-1 on Insulin Secretion in Type 2 Diabetes. *DIABETES*, VOL. 59.
54. Schirra J., Nicolaus M., Roggel R., Katschinski M., Storr M., Woerle H. J., Goke B. (2006). Endogenous glucagon-like peptide 1 controls endocrine pancreatic secretion and antro-pyloroduodenal motility in humans. *Gut* 55:243–251.
55. Scott L.J. (2013). Lixisenatide: a review of its use in patients with type 2 diabetes mellitus. *BioDrugs* 27(5):509-23.
56. Semiz S., Dujic T., Causevic A. (2013). Pharmacogenetics and personalized treatment of type 2 diabetes. Review Article. *Biochemia Medica* 23(2):154–71.
57. Song, X., Jia H., Jiang Y., Wang L., Zhang Y., Mu1 Y., Liu Y. (2015). Anti-atherosclerotic effects of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) based therapies in patients with type 2 Diabetes Mellitus: A meta-analysis. *Sci. Rep.* 5, 10202; doi: 10.1038/srep10202.
58. Suchankova P., Yan J., Schwandt M.L., Stangl B.L., Caparelli E.C., Momenan R., Jerlhag E., Engel J.A., Hodgkinson C.A., Egli M., Lopez M.F., Becker H.C., Goldman D., Heilig M., Ramchandani V.A., Leggio L. (2015). The glucagon-like peptide-1 receptor as a potential treatment target in alcohol use disorder: evidence from human genetic association studies and a mouse model of alcohol dependence. *Transl Psychiatry* 5, e583; doi:10.1038/tp.2015.68.
59. Sudchada P., Scarpace K. (2014). Transcription factor 7-like 2 polymorphisms and diabetic retinopathy: a systematic review. *Genetics and Molecular Research* 13 (3): 5865-5872.
60. Tentolouris N., Andrianakos A., Karanikolas G., Karamitsos D., Trontzas P., Krachtis P., Christoyannis F., Tavaniotou E., Nikolia Z., Kaskani E., Leonidas Kontelis, Sfikakis P. P. (2012). Type 2 diabetes mellitus is associated with obesity, smoking and low socioeconomic status in large and representative samples of rural, urban, and suburban adult Greek populations. *HORMONES* 11(4):458-467.

61. Toft-Nielsen M.B., Damholt M.B., Madsbad S. Hilsted L.M., Hughes T.E., Michelsen B.K., Holst J.J. (2001). Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3717–23.
62. Topi E. (2014). The role of pharmacogenetics in the treatment of diabetes mellitus. Review Article. *J Med Biochem* 33: 58 –70.
63. Trujillo J. M., Nuffer W., Ellis S. L. (2015). GLP-1 receptor agonists: a review of head to head clinical studies. *Ther Adv Endocrinol Metab*, Vol. 6(1) 19–28.
64. Van Can J., Sloth B., Jensen C.B., Flint A., Blaak E.E., WHMS (2014). Effects of the once-daily GLP-1 analog liraglutide on gastric emptying, glycemic parameters, appetite and energy metabolism in obese, non-diabetic adults. *International Journal of Obesity* 38, 784–793.
65. Vinetti G., Mozzini C., Desenzani P., Boni E., Bulla L., Lorenzetti I., Romano C., Pasini A., Cominacini L., Assanelli D. (2015). Supervised exercise training reduces oxidative stress and cardiometabolic risk in adults with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Sci. Rep.* 5, 9238; DOI:10.1038/srep09238.
66. World Health Organization (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva:WHO, Report No. WHO/NCD/NCS/99.2.
67. Zhou Y., Park S.-Y., Su J., Bailey K., Ottosson-Laakso E., Shcherbina L., Oskolkov N., Zhang E., Thevenin T., Fadista J., Bennet H., Vikman P., Wierup N., Fex M., Rung J., Wollheim C., Nobrega M., Renstro E., Groop L., Hansson O. (2014). TCF7L2 is a master regulator of insulin production and processing. *Human Molecular Genetics*, Vol. 23, No. 24 6419–6431.
68. Καζάκος Κ. (2009). Φαινόμενο ινκρετίνης. Δράσεις GLP-1, GIP, DPP-4. *Ελληνικά διαβητολογικά χρονικά* 22, 2: 102 -107.
69. Καναβάκης Ε., Ξαϊδάρα Α. (2001). Ανασκόπηση: Η χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. *ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ*. 18(5): 475-484.
70. Κατσίκη Ν., Ηλιάδης Φ., Ζαντίδης Α., Διδάγγελος Τ. (2010). Σακχαρώδης Διαβήτης: Διάγνωση και Ταξινόμηση. *Ελληνικά διαβητολογικά χρονικά* 23, 1: 78-86.

71. Μελινώδης Α. (2006). Ινκρετινομιμητικά και DPP-4 αναστολείς: Οι νέες θεραπευτικές προτάσεις στην αγωγή του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2. Ελληνικά διαβητολογικά χρονικά 19, 4:261-271.

Παράρτημα

Διάλυμα SSC 20x:

- 3 M sodium chloride
 - 0,3 M sodium citrate
- } pH=7,0

TAE 50x:

- 121 gr Trisbase
- 28,5 ml acetic acid
- 50 ml EDTA 0,5 M
- ddH₂O μέχρι τα 500 ml

EDTA 0.5M (pH: 8,0):

- 93,1 gr Na₂EDTA σε 400 ml ddH₂O
- NaOH μέχρι τα 500 ml και pH=8,0

Αποθήκευση στους 4°C

EtBr (10mg/ml):

- 100 mg EtBr σε 10 ml H₂O

Gel loading buffer (6x):

- 5 ml glycerol
- 1 ml bromophenol blue
- 0,5 ml TBE 20X
- 3,5 ml ddH₂O

Αποθήκευση στους 4°C ή 20°C