

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI**



TEZĂ DE DOCTORAT

**“STUDIUL POLIMORFISMULUI GENEI TCF7L2 LA
PACIENȚII CU DIABET ZAHARAT TIP 2”
SPECIALITATEA ENDOCRINOLOGIE**

REZUMAT

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROFESOR DOCTOR CONSTANTIN DUMITRACHE**

**DOCTORAND
ALEXANDRA CĂTĂLINA BULGĂR**

**BUCUREȘTI
2016**

MULȚUMIRI

În primul rând doresc să-i mulțumesc **Domnului Profesor Dr. Constantin Dumitrache** pentru sprijinul și grija cu care mi-a îndrumat pașii de-a lungul anilor în cariera mea și pentru toate sfaturile pe care mi le-a oferit pentru realizarea acestei lucrări.

De asemenea doresc, să le mulțumesc tuturor **membrilor comisiei de examinare: doamnei Prof. Dr. Ileana Duncea, doamnei Conf. Dr. Diana Păun, domnului Prof. dr. Eduard Circo** pentru onoarea pe care mi-au făcut-o acceptând propunerea de a face parte din comisie și pentru atenta examinare a lucrării și pentru observațiile primite.

Mulțumiri speciale **Domnului Conferențiar Dr. Cristian Guja** care m-a îndrumat în realizarea acestei teze.

Doamnei dr. Anca Violeta Gafencu și domnișoarei drd. Elena Fuior de la Institutul de Biologie și Patologie Celulară “Nicolae Simionescu” doresc să le aduc mulțumiri deosebite pentru efortul depus în realizarea analizei genetice a probelor.

Mulțumiri aduc și echipei de la laboratorul **Centrului Medical Matei Basarab** unde s-au lucrat probele de biochimie.

Și nu în ultimul rând doresc să mulțumesc celor dragi mie, **mamei mele Maria Cristina, surorii mele Andreea, cumnatului meu Felix, lui Alex și întregii familii** care m-au susținut în toți acești ani și fără de care nu aș fi putut duce la bun sfârșit această lucrare și cărora le și dedic lucrarea de față.

Dedic această lucrare mamei mele Maria Cristina, familiei

și

Domnului Profesor Dr. Constantin Dumitrache

CUPRINS

CAPITOLUL I

NOȚIUNI INTRODUCTIVE 1

CAPITOLUL II

**POLIMORFISMUL GENEI TCF7L2 ȘI ROLUL SĂU ÎN
ETIOPATOGENIA DIABETULUI ZAHARAT TIP 2** 2

1. Introducere 2

2. Polimorfismul genei TCF7L2 și rolul său în apariția diabetului zaharat
tip 2 2

CAPITOLUL III

**MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI
MATERIAL ȘI METODĂ** 5

1. Motivația, scopul și obiectivele studiului 5

1.1. Motivația studiului 5

1.2. Scopul studiului 5

1.3. Obiectivele studiului 5

2. Material și metodă 6

2.2. Evaluarea clinică și biologică a subiecților din studiu 6

2.3. Analiza genetică: Izolarea ADN-ului și pirosecvențierea 7

2.3.1. Principiul pirosecvențierii 7

2.3.2. Obținerea ADN-ului genomic 8

2.3.3. Pirosecvențierea probelor de ADN genomic 8

1) Designul primerilor utilizați pentru studiul polimorfismelor
rs7903146 și rs290487 prin pirosecvențiere 8

2) Optimizarea condițiilor experimentale pentru obținerea produsului de
PCR 9

3. Evaluarea rolului polimorfismelor rs7903146 și rs290487 ale genei
TCF7L2 în susceptibilitatea pentru diabetul zaharat tip 2. 17

4. Analiza statistică a datelor 17

CAPITOLUL IV

REZULTATE 18

1. Caracterizarea celor două loturi de subiecți 18

2. Analiza polimorfismelor rs7903146 și rs290487 ale genei TCF7L2 în
loturile de studiu 21

2.1. Analiza polimorfismului rs7903146 al genei TCF7L2 în loturile de
studiu 21

2.2. Analiza polimorfismului rs290487 al genei TCF7L2 în loturile de
studiu 22

2.3. Analiza frecvenței alelei C și respectiv T pentru fiecare polimorfism
în loturile de studiu 23

3. Analiza asocierii modelelor genetice cu DZ tip 2 în loturile de studiu 24

4. Predicția riscului de DZ tip 2 în funcție de polimorfism pentru cele 28

două loturi	
4.1. Predicția riscului DZ tip 2 pentru polimorfismul rs7903146 al genei TCF7L2 pentru cele două loturi	28
4.2. Predicția riscului de DZ tip 2 pentru polimorfismul rs290487 al genei TCF7L2 pentru cele două loturi	29
5. Analiza caracteristicilor clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi în funcție de genotipurile polimorfismelor rs7903146 și rs290487 ale genei TCF7L2	30
5.1. Analiza caracteristicilor clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi în funcție de genotipurile polimorfismului rs7903146 al genei TCF7L2	30
5.2. Analiza caracteristicilor clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi în funcție de genotipurile polimorfismului rs290487 al genei	32
6. Analiza relației dintre factorii de risc și genotipurile celor două polimorfisme pentru ambele loturi studiate	34
CAPITOLUL V	
DISCUȚII, ORIGINALITATEA LUCRĂRII, CONCLUZII	35
Discuții	35
Originalitatea lucrării	38
Concluzii	38
BIBLIOGRAFIE	40

CAPITOLUL I

NOȚIUNI INTRODUCTIVE

Diabetul zaharat (DZ) reprezintă o afecțiune cronică, evolutivă, cu importante complicații micro și macrovasculare care se caracterizează prin hiperglicemie cronică. Acest sindrom heterogen din punct de vedere etiopatogenic, clinic și terapeutic determină o tulburare a metabolismului energetic ce implică și alterarea metabolismelor glucidic, protidic, lipidic datorită unei insulinosecreții deficitare a celulelor beta-pancreatice pe fondul unei insulinorezistențe periferice de diverse grade (1).

Conform datelor raportate pentru anul 2015 de către International Diabetes Federation (IDF) s-a observat că în întreaga lume numărul cazurilor de diabet zaharat a fost de 415 milioane estimând o creștere în anul 2040 la 642 milioane de cazuri, 193 milioane de cazuri de diabet nefiind însă diagnosticate, ceea ce înseamnă deci că unul din doi adulți au rămas nediagnosticsați (2).

De asemenea, s-a raportat pentru anul 2015 că unul din 11 adulți a fost diagnosticat cu diabet zaharat și se estimează pentru anul 2040 că unul din 10 adulți va avea diabet zaharat (2). În anul 2015, aproximativ 5 milioane de decese s-au datorat diabetului zaharat (2).

Cele mai recente date pentru România sunt furnizate de către Studiul Național PREDATORR (Studiul Național privind Prevalența Diabetului, Prediabetului, Supraponderiei, Obezității, Dislipidemieii, Hiperuricemieii și Boliilor Cronice de Rinichi), realizat de către Societatea Română de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice în parteneriat cu Societatea Română de Nefrologie, studiu debutat în anul 2013 și finalizat în anul 2014 (3).

Rezultatele Studiului PREDATORR au arătat că prevalența diabetului zaharat în România este de 11,6%, dintre persoanele cu vârsta cuprinsă între 20 și 79 de ani, 1752000 au diabet zaharat (3).

Analizând aceste date constatăm ca diabetul zaharat tip 2 reprezintă o reală problemă de sănătate la nivel mondial fiind o afecțiune care alterează calitatea vieții pacientului prin complicațiile cronice pe care acesta le dezvoltă în timp.

Se impun astfel măsuri atât pentru diagnosticarea în stadii precoce a afecțiunii cât și măsuri ce vizează schimbarea stilului de viață și instituirea precoce a terapiei, dar și stabilirea unor strategii de prevenție a bolii.

CAPITOLUL II

POLIMORFISMUL GENEI TCF7L2 ȘI ROLUL SĂU ÎN ETIOPATOGENIA DIABETULUI ZAHARAT TIP 2

1. Introducere

Diabetul zaharat tip 2 (DZ tip 2) este o boală multifactorială care are drept cauză disfuncția beta-celulară și/sau rezistența la insulină, în etiopatogenia sa fiind implicați atât multiplii factori genetici cât și anumiți factori de mediu cum ar fi: alimentația și stilul de viață existent în țările cu nivel socio-economic ridicat, obezitatea, sedentarismul, stresul (4).

Dacă în urmă cu mai bine de un deceniu se considera că doar DZ tip 1 se asociază cu anumite gene, numeroase studii mai recente au dovedit implicarea factorilor genetici în fiziopatologia DZ tip 2, existând o serie de argumente ce susțin predispoziția genetică pentru DZ tip 2, și anume: agregarea familială a bolii, studiile pe gemeni monoziagoți, precum și prevalența diferită a afecțiunii în diverse populații(4).

Studiul realizat de către Xue Sun *et al.* în 2014 arată că până în prezent au fost identificați peste 70 de loci care sunt asociați cu DZ tip 2, dintre care 45 de loci au fost identificați în populația europeană și 29 de loci în populația Asiei de Sud-Est (5).

Studiul genelor candidate a identificat o serie de gene asociate *defectului insulinosecretor* (6-13), precum și gene asociate *insulinorezistenței* (7,14-16).

Factorii genetici acționează la nivelul fiecărei componente implicate în mecanismul fiziopatologic care conduce la apariția DZ tip 2, atât la nivelul celulelor beta-pancreatice cât și la nivelul țesuturilor periferice.

2. Polimorfismul genei TCF7L2 și rolul său în apariția diabetului zaharat tip 2

Studiile desfășurate în ultimii ani au demonstrat rolul important al factorilor genetici în fiziopatologia DZ tip 2. În anul 2006, Grant *et al.* a demonstrat rolul polimorfismului genei TCF7L2 (*T-cell factor 7-like2, Transcription factor 7-like 2 gene*) în riscul apariției DZ tip 2 în populația Islandei (17).

Gena TCF7L2 (TCF4- *Transcription factor 4*) este considerată una dintre cele mai importante gene de susceptibilitate pentru apariția DZ tip 2, fiind o genă care codifică un factor de transcripție care joacă un rol important în *calea de semnalizare Wnt (Wingless, the Drosophila melanogaster segment-polarity gene, and Integrase-1, the vertebrate homologue)*, calea clasică, care este implicată în dezvoltarea insulelor pancreatice precum și într-o serie de procese celulare (18).

În anul 2000, Duval *et al.* a descris pentru prima dată structura genei TCF7L2 umană care este localizată la nivelul cromozomului 10q25.3 (19).

De asemenea, structura genei a fost descrisă și de către alți autori dovedindu-se că gena TCF7L2 este compusă din 17 exoni, dintre care cinci sunt alternativi (exonul 4 la capătul 5' și exonii 13–16 la capătul 3') (Figura 1) (19,20,21).

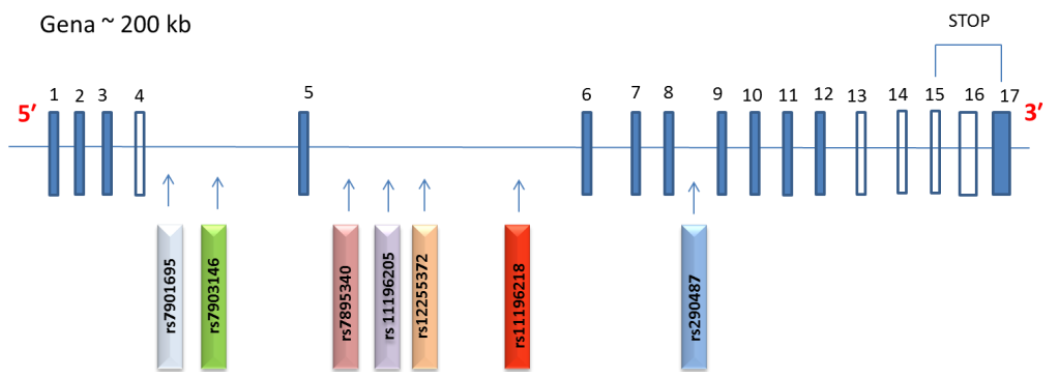


Figura 1. Structura genei TCF7L2 și polimorfismele asociate cu riscul de DZ tip 2 (adaptat după Ip Wilfred *et al.* 2012) (22)

Gena TCF7L2 este compusă din 17 exoni, dintre care cinci sunt alternativi (exonul 4 la capătul 5' și exonii 13–16 la capătul 3'). Sunt ilustrate și polimorfismele genei TCF7L2 asociate cu riscul de DZ tip 2 în diverse populații (22).

Gena TCF7L2 este exprimată la nivelul celulelor beta-pancreatice precum și la nivelul altor țesuturi sau organe implicate în homeostazia metabolică cum ar fi: ficatul, creierul, țesutul adipos subcutanat și omental precum și la nivelul mușchilor scheletici, având însă o expresie scăzută la acest nivel (23).

Cercetările realizate în ultimii ani au demonstrat rolul genei TCF7L2 la nivelul pancreasului (Figura 2) (22).

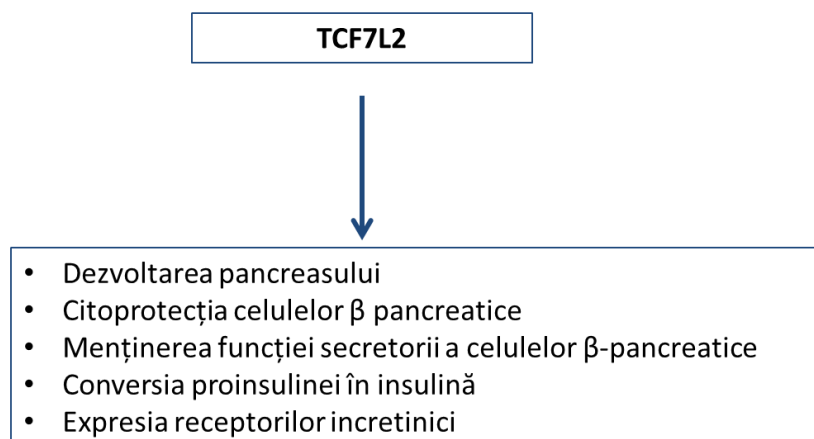


Figura 2. Rolul genei TCF7L2 la nivelul pancreasului (22)

Până în prezent au fost identificate 8 polimorfisme ale genei TCF7L2 care se asociază cu riscul apariției DZ tip 2 într-o varietate de grupuri populaționale și etnice, existând însă și câteva rezultate contradictorii (24).

Dintre cele 8 polimorfisme, 5 au fost descrise într-o regiune largă în jurul exonului 5: *rs7901695*, *rs7903146*, *rs7895340*, *rs11196205*, *rs12255372*, iar *rs11196218* în apropierea exonului 6. Dintre acestea, *rs12255372* și *rs7903146* s-au asociat cel mai frecvent cu DZ tip 2, iar polimorfismul *rs7903146* reprezintă polimorfismul care s-a asociat cel mai puternic cu riscul de DZ tip 2 în populația caucaziană (17,24).

Două dintre polimorfisme, și anume *rs290487* și *rs11196218* au fost descrise în studii realizate în Asia de Est (25-34).

Studiile referitoare la polimorfismul *rs4506565* au fost realizate doar pe caucazieni și indieni și în câteva grupuri etnice (35-37).

Polimorfismul *rs7903146* este localizat la nivelul unei regiuni necodante și anume la nivelul intronului 3. **Alela de risc T** a fost descrisă în populația europeană și cea africană dar nu a fost descrisă în populația chineză din regiunea Han (25,26,29,31,38,39). Conform meta-analizei realizată de către Peng S. *et al.*, frecvența **alelei minore (alela T)** în cazul polimorfismului *rs7903146* a variat între 2,4% și 41,6%, cu o medie de 21,3% (24).

Varianta intronică *rs290487* a genei TCF7L2 este localizată aproape de capatul 3' al genei TCF7L2. La acest nivel se află domeniul de legare pentru CtBp (*C-terminal binding protein*) implicat în represia activității transcripționale a TCF7L2 (19,40).

În ceea ce privește **alela minoră (alela C)** pentru **polimorfismul rs290487**, Peng S. *et al.* a arătat că studiile care au fost realizate în Asia de Est au raportat o frecvență a acesteia cuprinsă între 33,6% și 62%, cu o medie de 43% (24).

Au fost propuse câteva mecanisme care ar explica asocierea dintre polimorfismul genei TCF7L2 și riscul apariției DZ tip 2: reducerea masei celulelor beta-pancreatice, alterarea procesării insulinei și eliberării acesteia, alterarea semnalului GLP-1 în celulele beta-pancreatice, creșterea producției hepatice de glucoză, rezistența la insulină la nivel periferic și modificarea structurii cromatinei (Figura 3) (22,41-44).

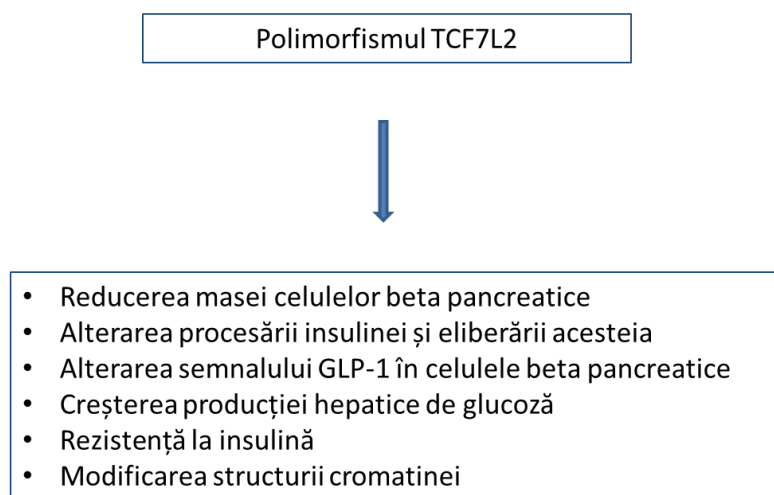


Figura 3. Mecanisme care ar explica asocierea dintre polimorfismul TCF7L2 și riscul apariției DZ tip 2

CAPITOLUL III

MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

MATERIAL ȘI METODĂ

1. Motivația, scopul și obiectivele studiului

1.1 . Motivația studiului

TCF7L2 (*T-cell factor 7-like2*, cunoscut ca și TCF4) este unul dintre factorii de transcripție care joacă un rol important în calea de semnalizare Wnt, cale care are un rol în proliferarea celulară, diferențiere, apoptoză, menținerea homeostaziei tisulare precum și în diverse procese metabolice (45). Polimorfismul **rs7903146** al genei TCF7L2 este cel mai important marker genetic asociat cu diabetul zaharat tip 2 (46) fiind de asemenea asociat cu diabetul gestațional (47) precum și cu diabetul latent autoimun al adultului (LADA) (48). Și alte polimorfisme ale TCF7L2 precum **rs290487** par a fi implicate în predispoziția pentru diabetul zaharat tip 2. Există studii care au demonstrat o corelație între cele două polimorfisme și riscul crescut pentru apariția DZ tip 2 (49).

1.2 . Scopul studiului

Având în vedere rezultatele studiului PREDATORR care au demonstrat o prevalență crescută a diabetului zaharat în sudul României, în regiunea București-Ilfov înregistrându-se o prevalență de 12,79% (3), am analizat prezența polimorfismului genei TCF7L2 considerată a fi una dintre cele mai importante gene de susceptibilitate pentru DZ tip 2 în această populație. În lucrarea de față am analizat pentru prima dată în țara noastră asocierea dintre polimorfismele **rs7903146** și **rs290487** ale genei TCF7L2 și statusul diabetic la subiecți caucazieni din sud-estul României.

Pentru analiza genetică s-a utilizat secvențierea directă a ADN-ului genomic, prin metoda pirosecvențierii, o metodă introdusă relativ recent în practica curentă de laborator.

1.3 . Obiectivele studiului

În această lucrare mi-am propus următoarele obiective:

- De a evalua rolul polimorfismelor **rs7903146** și **rs290487** ale genei TCF7L2 în susceptibilitatea pentru DZ tip 2 în populația din sud-estul României.
- De a investiga dacă polimorfismele **rs7903146** și **rs290487** ale genei TCF7L2 contribuie la variabilitatea fenotipului clinic și la apariția complicațiilor DZ tip 2.

2. Material și metodă

2.1 . Selecția pacienților

Studiul s-a desfășurat în perioada ianuarie 2015-martie 2015 pe un lot 83 de subiecți caucazieni de naționalitate română.

Studiul s-a desfășurat în conformitate cu legislația națională și europeană în vigoare (Declarația de la Helsinki), înrolarea pacienților realizându-se cu acordul acestora și după semnarea consimțământului informat (50).

Au fost incluși în studiu pacienți cu vârsta cuprinsă între 30 și 73 de ani diagnosticați cu diabet zaharat tip 2 conform criteriilor ADA 2015 (51) și subiecți sănătoși care s-au prezentat pentru consiliere nutrițională.

Au fost excluși din studiu pacienții cu:

- IMC <18 kg/m²;
- Patologie malignă;
- Boli autoimune;
- Insuficiență renală severă (eGFR<30mL/min/1,73m²);
- Afectare hepatică severă;
- Infecția cu virusurile hepatice B și C, infecția cu HIV;
- Diagnosticul de sarcină în evoluție;
- Pacienții incapabili de a înțelege și de a semna consimțământul informat.

În lotul pacienților cu DZ tip 2 au fost incluși acei subiecți care au fost diagnosticați cu DZ tip 2 conform criteriilor ghidului ADA 2015, iar lotul control a fost constituit din subiecți care nu au întrunit criteriile de DZ conform aceluiași ghid.

2.2 . Evaluarea clinică și biologică a subiecților din studiu

S-a utilizat un chestionar standard pentru a colecta informații privind sexul, vârsta, vârsta la diagnosticul bolii, istoricul familial de boli metabolice și cardio-vasculare, tratamentul urmat, statusul de fumător, consumul de alcool, nivelul de activitate fizică, prezența altor patologii.

Informațiile obținute din studiu nu au influențat diagnosticul sau tratamentul pacienților.

Participanții au fost instruiți cu privire la postul alimentar nocturn, au întrerupt fumatul, consumul de alcool și de cafea și au evitat efortul fizic excesiv după ora 22 în ziua anterioară examinării.

Toți participanții au fost supuși unui examen clinic și unei evaluări paraclinice de laborator.

Evaluarea clinică a inclus:

- măsurarea taliei (cm) cu taliometrul calibrat;
- determinarea greutății (kg) cu cântar calibrat;
- calcularea indicelui de masă corporală IMC (kg/m²);
- măsurarea circumferinței abdominale (cm);
- măsurarea tensiunii arteriale sistolice și diastolice;
- evaluarea neurologică cu testarea sensibilității tactile, termice și dureroase în vederea stabilirii gradului de afectare neurologică: depistarea neuropatiei vegetative sau senzitive;

- consultul oftalmologic de specialitate pentru aprecierea prezenței retinopatiei diabetice;
- consultul cardiologic cu efectuarea EKG-ului.

Indicele de masă corporală (IMC sau BMI) este definit ca raportul dintre greutatea corporală (măsurată în kilograme) și pătratul înălțimii (măsurată în metri).

Circumferința abdominală (CA) a fost măsurată la subiectul aflat în ortostatism prin aplicarea centimetrului la jumătatea distanței dintre rebordul costal și creasta iliacă pe linia axilară medie.

Obezitatea a fost definită pentru $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$. Obezitatea abdominală a fost definită pentru $CA \geq 102 \text{ cm}$ la bărbați și $\geq 88 \text{ cm}$ la femei.

Pacienții care fumează constant cel puțin o țigară pe zi au fost considerați fumători. S-a înregistrat consumul de alcool. Pacienții care au avut activitate fizică cel puțin o oră pe săptămână au fost considerați activi din punct de vedere fizic.

Tensiunea arterială a fost măsurată în poziție sezândă/clinostatism, la nivelul antebrăului stâng după o perioadă de 5 minute de repaus de către medic și asistenta medicală cu același tensiometru (ce a fost supus periodic testelor de calibrare). Media a trei măsuratori realizate la interval de 1 minut a fost utilizată pentru a calcula tensiunea arterială sistolică și cea diastolică.

Hipertensiunea arterială a fost definită ca tensiunea arterială $\geq 140/90 \text{ mmHg}$ la vizita inițială sau la două vizite în interval de o lună. Pacientul a fost înregistrat ca având hipertensiune și dacă au existat documente care au atestat diagnosticul precum și dacă acesta urma tratament antihipertensiv.

Sângele venos s-a recoltat după 12 ore de post nocturn prin puncție venoasă. S-au dozat: glicemie, HbA1C%, colesterol, LDL-Colesterol, HDL-Colesterol, trigliceride, acid uric, creatinina, probele fiind analizate în același laborator.

În vederea izolării ADN-ului genomic, probele de sânge prelevate pe anticoagulant au fost prelucrate cu ajutorul unui kit comercial pentru izolarea ADN-ului genomic (Promega) pe un aparat Maxwell (Promega).

S-au recoltat probe de urină pentru efectuarea sumarului de urină și pentru determinarea microalbuminuriei (o valoare $\geq 30 \text{ mg/l}$ reprezentând un rezultat pozitiv).

Rata filtrării glomerulare a fost calculată conform ghidului KDIGO 2012 (52,53).

Pacienții au fost evaluați neurologic în vederea depistării neuropatiei diabetice și oftalmologic pentru depistarea retinopatiei diabetice.

2.3 . Analiza genetică: izolarea ADN-ului și pirosecvențierea

2.3.1. Principiul pirosecvențierii

Pirosecvențierea utilizează o succesiune de reacții enzimatic cuplate pentru analiza secvențelor de ADN, având ca bază generarea de pirofosfat la încorporarea unei nucleotide în catena ADN în curs de elongare de către enzima ADN polimeraza. Aceasta tehnică a fost inventată de Pål Nyrén în 1996 (54). Pirofosfatul generat este convertit la ATP de către enzima ATP sulfurilaza în prezența adenozin 5' fosfosulfat. ATP-ul produs este utilizat de enzima luciferaza în reacția asupra substratului luciferină, reacție în urma căreia se produce emisie de lumină, proporțională cu cantitatea de nucleotid încorporat. Nucleotidele

neîncorporate sunt degradate de enzima apiraza, iar ciclul se repetă la încorporarea următorului nucleotid. Distribuirea de substrate pentru ADN polimeraza se realizează după o ordine prestabilită, astfel încât emisia fiecărui peak luminos, care este captată de o cameră poate fi atribuită exact nucleotidei încorporate. Diagrama rezultată în urma unui astfel de experiment poartă denumirea de *pirogramă*. Pentru a evita utilizarea de către luciferază a dATP care ar trebui furnizat în amestecul inițial de dNTP, se utilizează analogul deoxiadenozin α -tiotrifosfat, care este un substrat pentru ADN polimeraza, dar nu și pentru luciferază. Metoda de pirosecvențiere a devenit o alternativă la secvențierea clasică Sanger și are aplicații atât pentru analiza polimorfismelor mononucleotidice (*SNP-single nucleotide polymorphism*), cât și pentru secvențieri la nivel genomic (55). Metoda a fost automatizată și aparatele de pirosecvențiere, software-ul dedicat și consumabilele aferente sunt comercializate în prezent de firma QIAGEN (SUA) în seria produselor PYROMARK™.

Un experiment complet de pirosecvențiere cu ajutorul acestui sistem implică parcurgerea următoarelor etape:

1. Regiunea conținând polimorfismul de interes este amplificată prin PCR cu o pereche de primeri specifici, dintre care unul este biotinitat la capătul 5'.
2. Produsul de PCR este reținut pe bile de Sepharose ce conțin streptavidina imobilizată.
3. Produsul de PCR imobilizat este denaturat cu ajutorul unei soluții de NaOH. Catena biotinitată este reținută datorită interacțiunii puternice cu streptavidina, în timp ce catena complementară este eliberată în soluție.
4. Un primer de secvențiere este hibridizat la catena de ADN biotinitat.
5. Are loc reacția de pirosecvențiere prin elongarea primerului în prezența amestecului corespunzător de enzime și substrate. Amestecul de enzime conține următoarele enzime: ADN polimeraza, ATP-sulfurilaza, luciferaza, apiraza. Amestecul de substrate conține alfa-s-d-adenozintio-trifosfat, d-CTP, d-GTP, d-TTP.
6. Fiecare încorporare corectă de nucleotide este însoțită de eliberarea unei cantități echivalente de pirofosfat, care conduce la o emisie de lumină, după cum s-a descris anterior.
7. Pirograma este analizată din punct de vedere al polimorfismului de interes.

2.3.2. Obținerea ADN-ului genomic

Probele de sânge au fost recoltate de la subiecți diabetici și sănătoși. Probele de sânge prelevate pe anticoagulant au fost prelucrate cu ajutorul unui kit comercial pentru izolarea ADN-ului genomic (Promega) pe un aparat Maxwell (Promega). Concentrațiile de ADN purificat au fost măsurate cu ajutorul unui spectrofotometru, folosind valoarea standard de 50 ng/ μ L pentru o valoare a absorbanței la 280 nm de 1.0.

2.3.3. Pirosecvențierea probelor de ADN genomic

- 1) *Designul primerilor utilizați pentru studiul polimorfismelor rs7903146 și rs290487 prin pirosecvențiere*

Pentru designul primerilor au fost preluate din baza de date SNP a National Institutes of Health (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) secvențele de ADN genomic care cuprindeau regiunile polimorfice de interes. Ambele polimorfisme reprezintă variații intronice C/T. Cele două

polimorfisme ocupă pe cromozomul 10 pozițiile: 112998590 pentru rs7903146 și respectiv 113149972 pentru rs290487.

Secvențele de nucleotide au fost utilizate în cadrul programului Pyromark Assay Design 2.0 pentru depistarea unei combinații optime de primeri de PCR și secvențiere (Tabelul I). Rezultatele sunt prezentate sub forma unui raport pentru fiecare polimorfism. Criteriile după care a fost evaluată calitatea primerilor individuali au constat în evaluarea conținutului de GC și a temperaturii de topire, formarea elementelor de structură secundară și stabilitatea capetelor 5' și 3'. Un scor a fost atribuit și comportării primerilor în combinație, precum în formarea de structuri de tip duplex. Primerii utilizați pentru secvențiere sunt descriși în Tabelul I.

Tabelul I. Secvența primerilor utilizați pentru studiul polimorfismelor rs290487 și rs7903146 rezultați din analiză prin programul *Pyromark Assay Design*.

Polimorfism	Primer
rs290487 primer F (5'-biotinilat)	5'-GTGAGTCTTCCAACCCAGTACA
rs290487 primer R	5'-ACCTACTCTTGGCCCATCTG
rs290487 primer secvențiere	5'-TCTCATTTTCAATTTTGC
rs7903146 primer F	5'-TTCTCTGCCTCAAAACCTAGC
rs7903146 primer R (5'-biotinilat)	5'-CTGAAACTAAGGGTGCCTCATA
rs7903146 primer secvențiere	5'-AGCTAAGCACTTTTGTAGAT

De notat că pentru polimorfismul rs7903146 secvențierea s-a realizat pe catena sens, citindu-se în pirograme direct secvențe de tipul C/C, C/T sau T/T, în timp ce pentru polimorfismul rs290487 secvențierea s-a realizat pe catena antisens, citindu-se în pirograme secvențe G/G, G/A sau A/A, care corespund secvențelor polimorfice C/C, C/T sau T/T pe catena sens. (Figurile 5-7).

Primerii cu secvența dorită au fost sintetizați de către firma QIAGEN (Tabelul I).

2) Optimizarea condițiilor experimentale pentru obținerea produsului de PCR

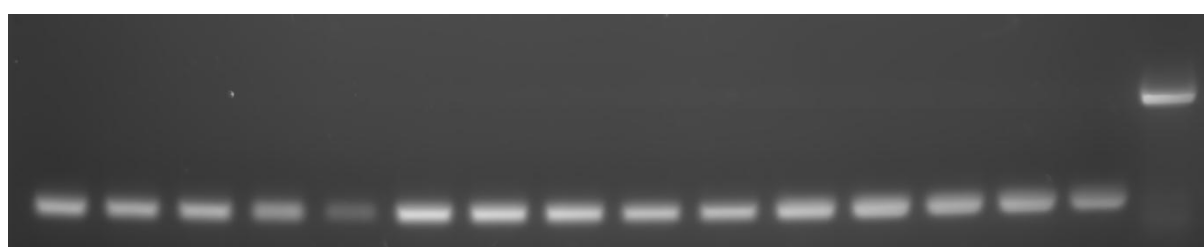
Reacțiile de PCR au fost realizate cu ajutorul unui kit PCR (QIAGEN), folosind un aparat LabCycler (Senso Quest).

Inițial, a fost necesară stabilirea condițiilor în care regiunile genice de interes sunt amplificate cu randament maxim în prezența primerilor a căror secvență a reieșit din programul *Pyromark Assay Design*. O serie de parametri experimentali au fost variați pentru optimizarea condițiilor de PCR și anume: concentrația de MgCl₂ și temperatura de hibridizare. Astfel, au fost testate următoarele concentrații de MgCl₂: 1.5, 2.0 și 2.5 mM. S-a realizat un gradient de temperatură cu valorile: 56,0, 58,0, 60,0, 62,0 și 64 °C, utilizând următorul program (Tabelul II).

Tabelul II. Etapele reacției PCR

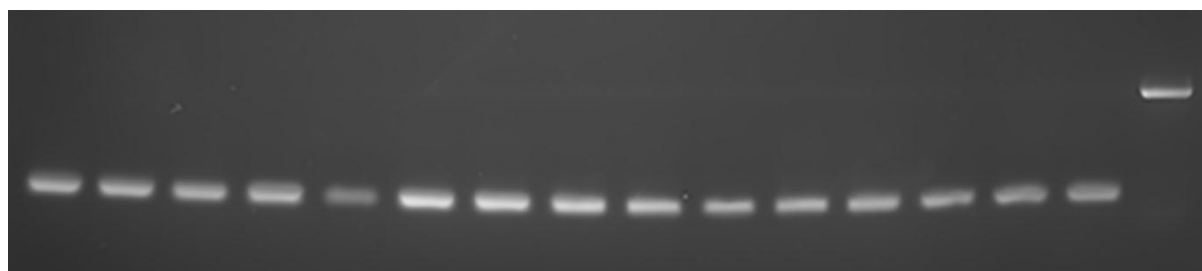
Pas	Condiții
I: denaturare	94 °C, 15'
II: ciclare (45 cicluri)	denaturare: 94 °C, 30''
	hibridizare: gradient (60±4 °C), 30''
	elongare: 72 °C, 30''
III: elongare finală	72 °C, 10'

Prođușii de PCR au fost evidențiați prin electroforeză în gel de agaroză 2% și colorare cu Midori Green (Nippon Genetics Europe), în prezența unor markeri ADN de mărime cunoscută. Imaginile au fost preluate cu ajutorul unei aparat BioSpectrum® MultiSpectral Imaging System și a soft-ware-ului dedicat UVP (Figurile 1 și 2).



ADNg(50ng)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	Marker
MgCl ₂ (mM)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	ADN (450pb)
Temp (°C)	56	58	60	62	64	56	58	60	62	64	56	58	60	62	64	64	64	

Figura 1. Optimizarea condițiilor experimentale pentru PCR pentru amplificarea regiunii adiacente polimorfismului rs7904146



ADNg(50ng)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	Marker
MgCl ₂ (mM)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	ADN (450pb)
Temp (°C)	56	58	60	62	64	56	58	60	62	64	56	58	60	62	64	64	64	

Figura 2. Optimizarea condițiilor experimentale pentru PCR pentru amplificarea regiunii adiacente polimorfismului rs290487

În urma analizei cantității de produs obținut, s-a stabilit o concentrație de 2.0 mM MgCl₂ și o temperatură de hibridizare de 58 °C. Aceasta a permis stabilirea unui program optim de PCR, valabil pentru ambele polimorfisme (Tabelul III).

Tabelul III. Programul final al reacției PCR

Pas	Condiții
I: denaturare	94 °C, 15'
II: ciclare (45 cicluri)	denaturare: 94 °C, 30''
	hibridizare: 58 °C, 30''
	elongare: 72 °C, 30''
III: elongare finală	72 °C, 10'

În toate reacțiile s-au utilizat 50 ng ADN_g per reacție, iar volumul total de reacție a fost 15μL. Diagramele ce evidențiază poziția primerilor de PCR și secvențiere pentru cele două polimorfisme sunt redată în figura 3 și respectiv 4.

Pirogramele reprezentative pentru cele două polimorfisme sunt redată în figurile 5, 6, și respectiv 7.

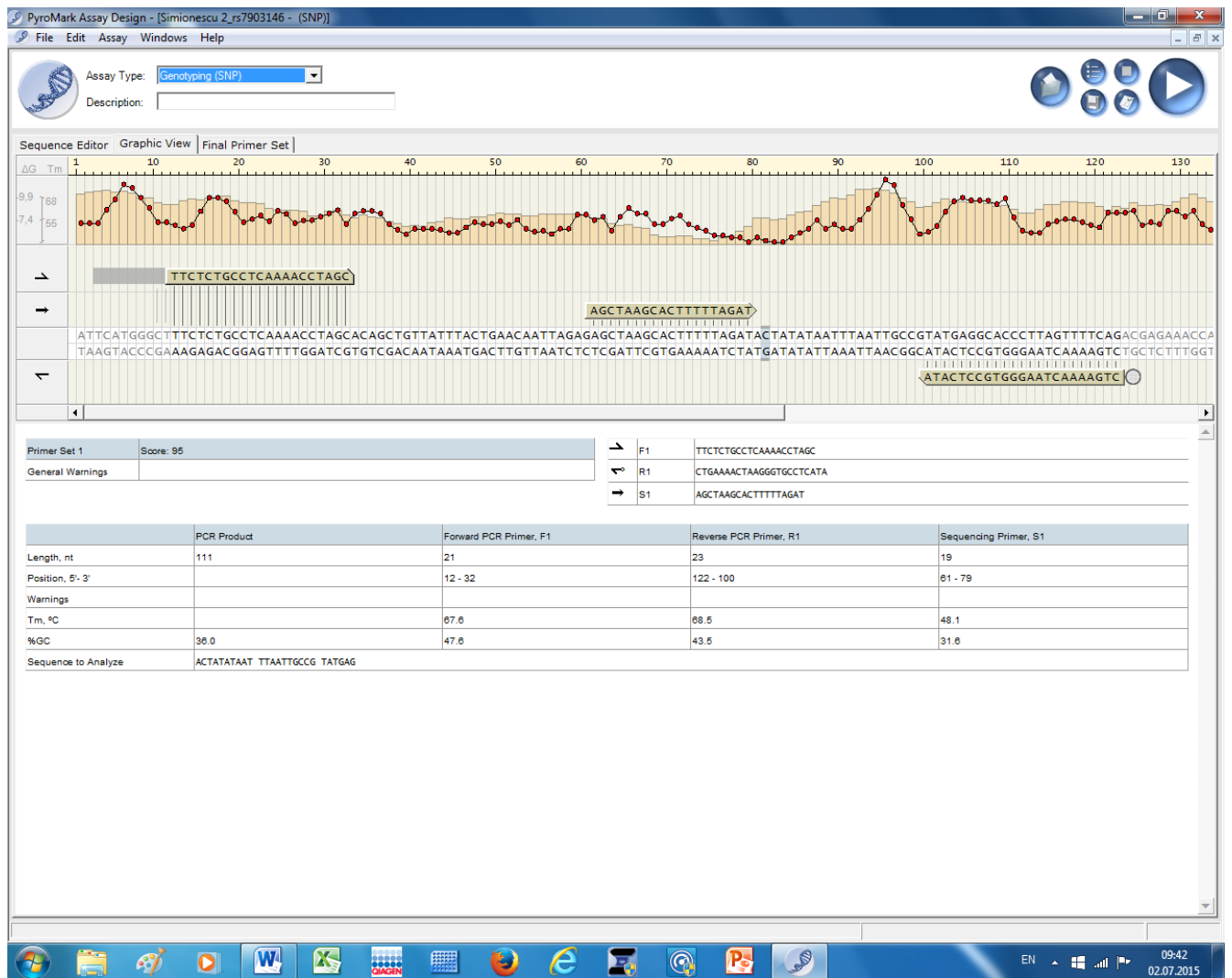


Figura 3. Diagrama schematică ce arată poziția primerilor de PCR (exteriori) și secvențiere (intern) pentru polimorfismul rs7903146 al genei TCF7L2

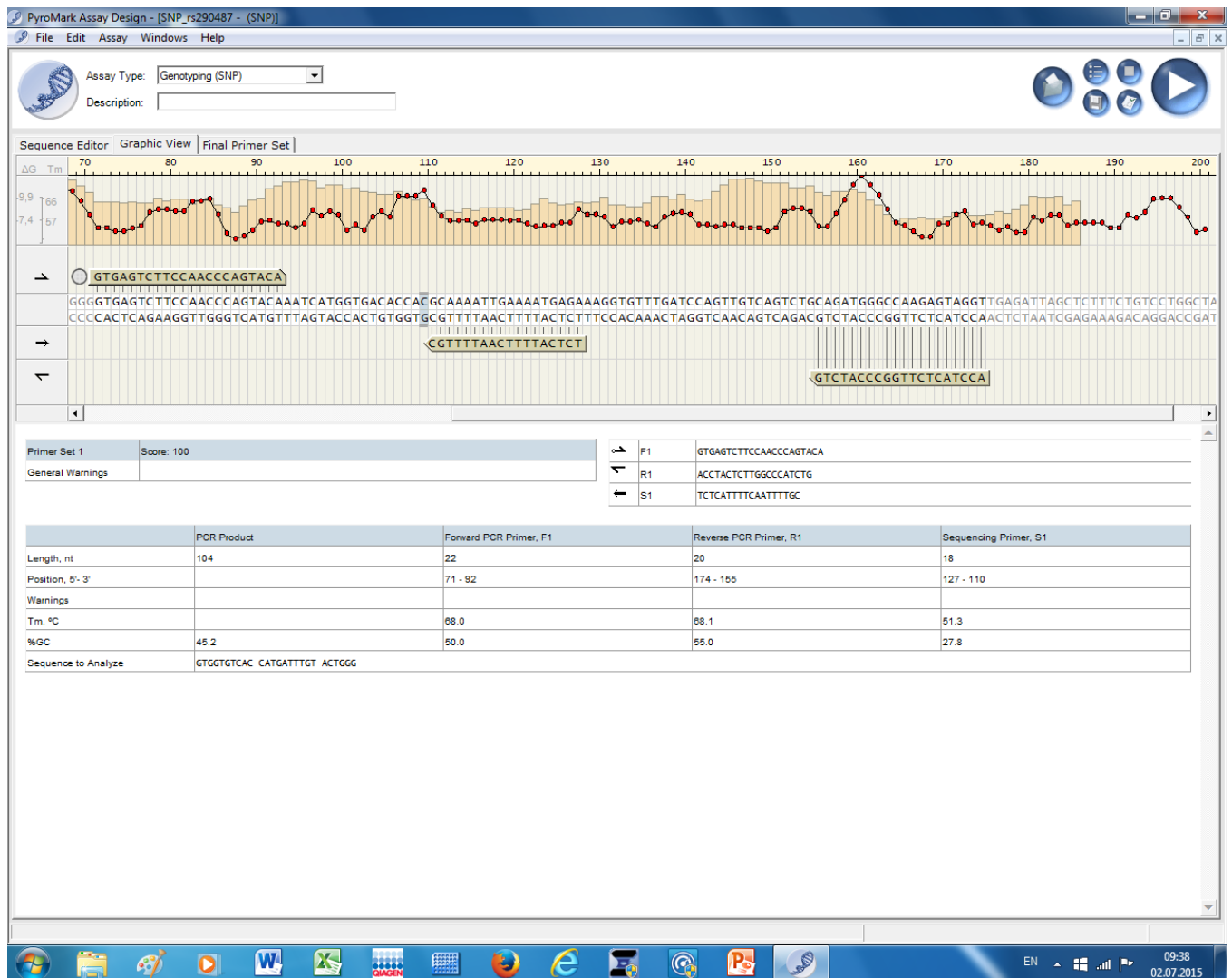
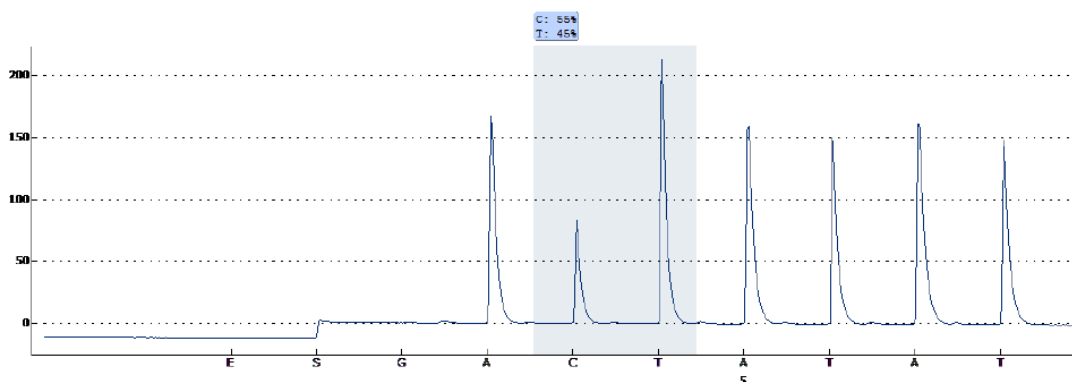


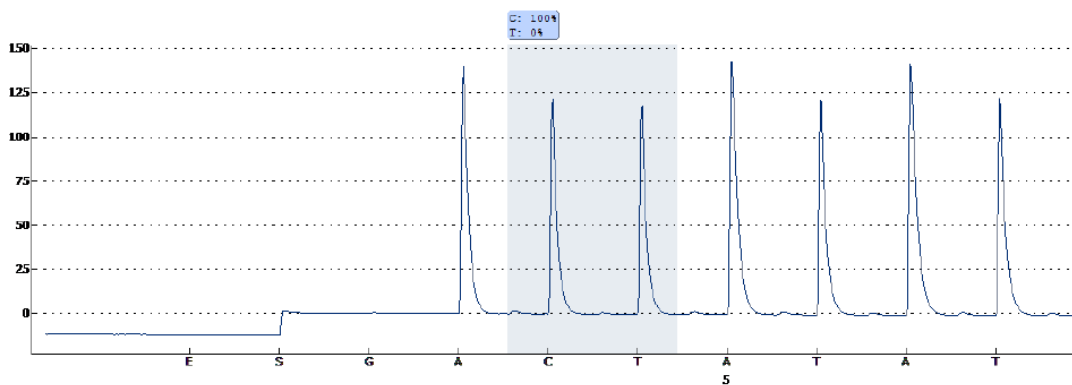
Figura 4. Diagrama schematică ce arată poziția primerilor de PCR (exteriori) și secvențiere (intern) pentru polimorfismul rs290487 al genei TCF7L2

AQ Pyrogram Report Run: Placa3_run79

Well: B5
Assay: assay79
Sample ID: 13
Sequence to analyze: AC/TTATATAATTTAATTGCCGTATGAG
Note: 10 ml



Well: B6
Assay: assay79
Sample ID: 14
Sequence to analyze: AC/TTATATAATTTAATTGCCGTATGAG
Note: 10 ml



Well: B7
Assay: assay79
Sample ID: 15
Sequence to analyze: AC/TTATATAATTTAATTGCCGTATGAG
Note: 10 ml

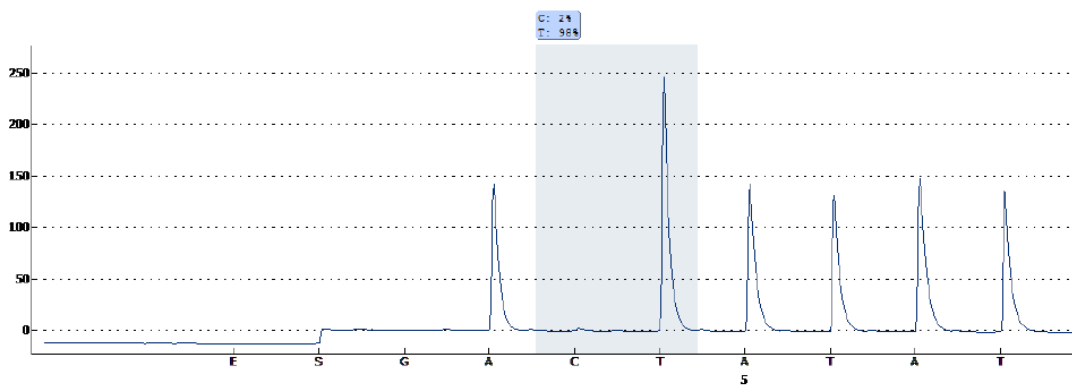
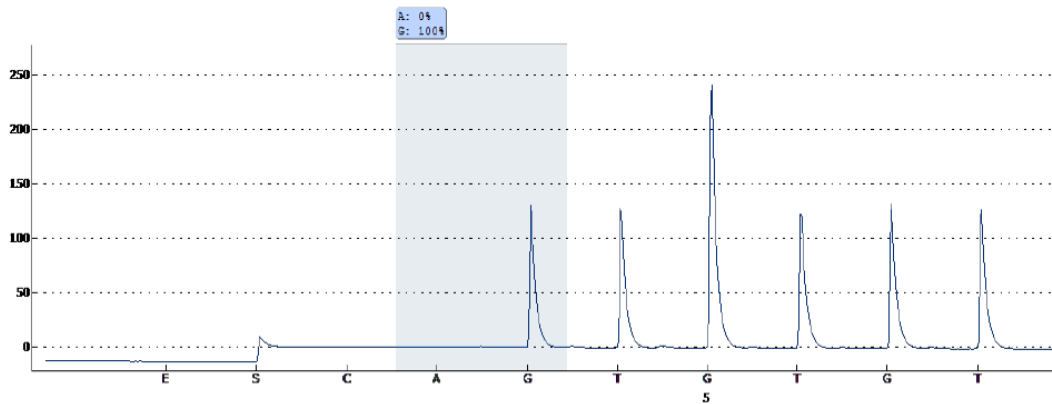


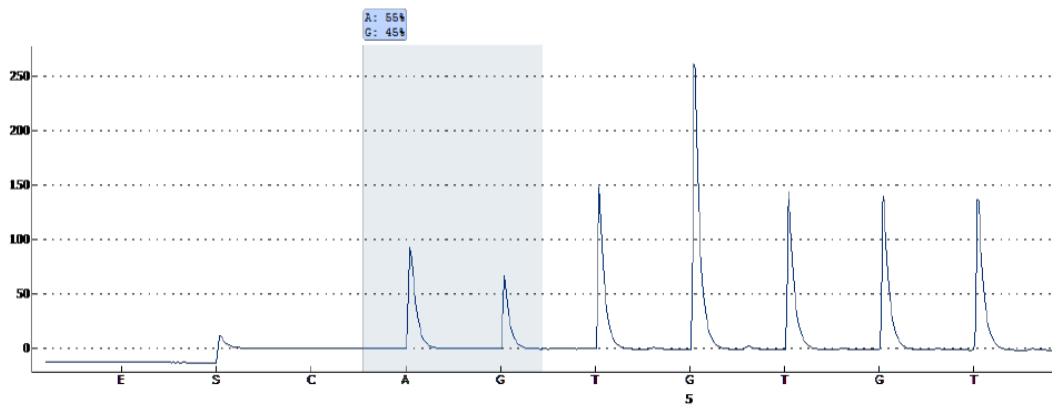
Figura 5. Pirograma reprezentativă pentru polimorfismul rs7903146 al genei TCF7L2

AQ Pyrogram Report Run: placa2

Well: B3
Assay: assay29
Sample ID: proba11
Sequence to analyze: G/ATGGTGCACCATGATTGTACTGGG



Well: B4
Assay: assay29
Sample ID: proba12
Sequence to analyze: G/ATGGTGCACCATGATTGTACTGGG



Well: B5
Assay: assay29
Sample ID: proba13
Sequence to analyze: G/ATGGTGCACCATGATTGTACTGGG

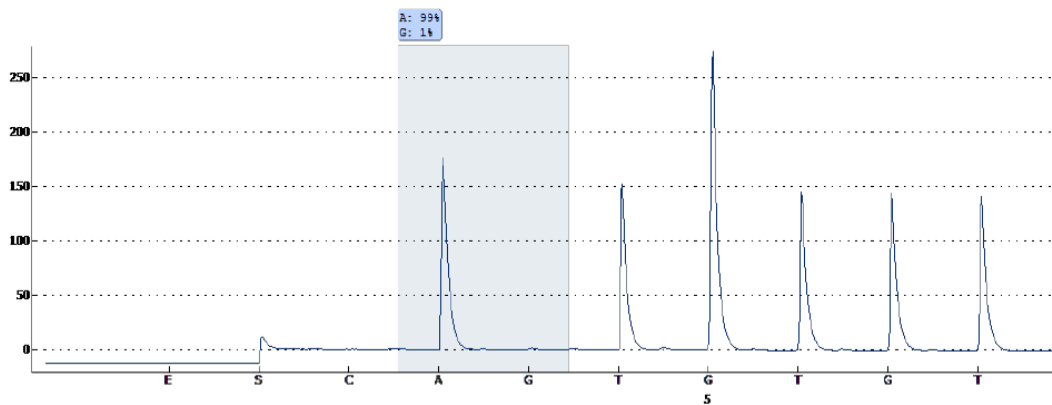


Figura 6. Pirograma reprezentativă pentru polimorfismul **rs290487** al genei TCF7L2

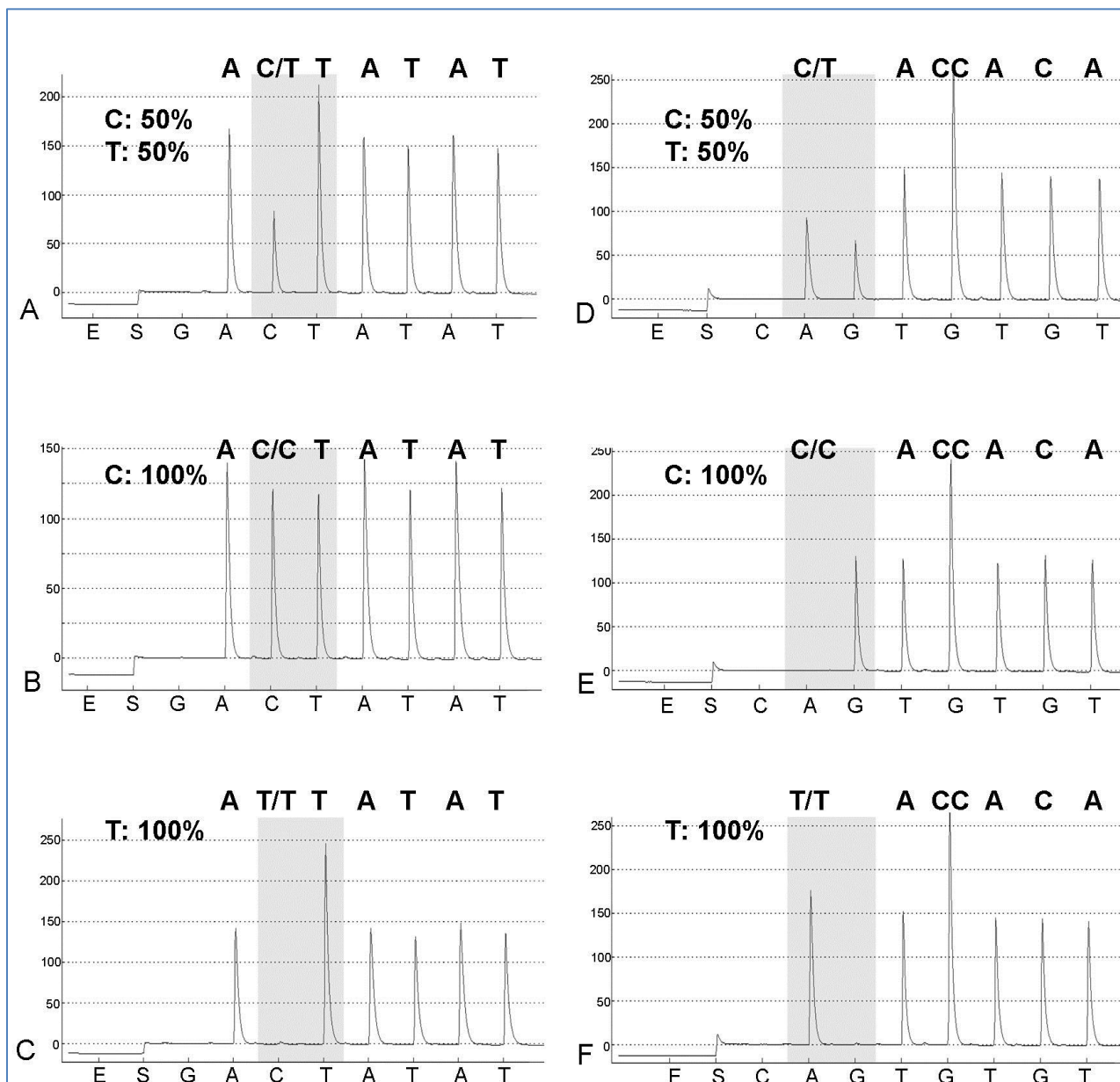


Figura 7. Pirograma reprezentativă pentru fiecare genotip al genei TCF7L2: polimorfismul **rs7903146** (A-C) și polimorfismul **rs290487** (D-F).

Pentru polimorfismul **rs7903146** secvențierea s-a realizat pe catena sens, citindu-se în pirograme direct secvențe de tipul C/C, C/T sau T/T, în timp ce pentru polimorfismul **rs290487** secvențierea s-a realizat pe catena antisens, citindu-se în pirograme secvențe G/G, G/A sau A/A, care corespund secvențelor polimorfice C/C, C/T sau T/T pe catena sens.

3. Evaluarea rolului polimorfismelor rs7903146 și rs290487 ale genei TCF7L2 în susceptibilitatea pentru diabetul zaharat tip 2.

Am analizat următoarele **modele genetice** pentru fiecare polimorfism în parte:

- Model dominant: C/C vs C/T+T/T,
- Model aditiv: C/C vs C/T vs T/T,
- Model recesiv: T/T vs C/C+C/T,
- Model co-dominant: C/T vs C/C+T/T,
- Model homozigot: C/C vs T/T,
- Model heterozigot: C/C vs C/T.

În vederea realizării obiectivelor propuse am analizat următoarele aspecte:

- Frecvența genotipului C/C, C/T, T/T și frecvența alelei C respectiv T pentru fiecare polimorfism în lotul control și în lotul pacienților diabetici.
- Existența unei asocieri semnificative între diagnosticul de DZ tip 2 și prezența unui anumit model genetic pentru fiecare polimorfism în parte în cele două loturi.
- Predicția riscului pentru DZ tip 2 în funcție de polimorfism.
- Caracteristicile clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi în funcție de genotipurile polimorfismelor rs7903146 și rs290487 ale genei TCF7L2.
- Relația dintre factorii de risc și genotipurile celor două polimorfisme pentru ambele loturi.

4. Analiza statistică a datelor

Datele au fost prelucrate cu ajutorul programului IBM-SPSS 18, 2010. Valoarea prag de semnificație statistică a fost stabilită pentru $p < 0,05$. Valoarea probabilității p a fost declarată la fiecare test aplicat, cu 3 zecimale. Pentru tabularea datelor ordinale am folosit prezentarea procentuală pe loturi cu o zecimală. Pentru prezentarea datelor numerice de tip scală s-a utilizat media și deviația standard.

Valorile matematice ale testelor au fost declarate pentru comparațiile semnificative, conform output-ului programului de statistică. În cazul testelor ne semnificative ($p \geq 0,05$) a fost raportată doar valoarea probabilității p .

Frecvențele alelelor au fost determinate prin numărarea genelor, iar modificarea echilibrului Hardy-Weinberg a fost verificată prin aplicarea *testului chi-pătrat*.

Caracteristicile clinice și de laborator au fost comparate folosind *testul t nepereche*, sau *modelul general linear*, sau *testul chi pătrat*, în funcție de prezumțiile îndeplinite. Pentru testul chi-pătrat s-a raportat OR și IC 95%. *Regresia logistică multivariată* a fost utilizată pentru a determina asocierea fiecărui polimorfism cu prezența diagnosticului de DZ tip 2, controlând efectele vârstei și ale sexului.

CAPITOLUL IV REZULTATE

1. Caracterizarea celor două loturi de subiecți

Caracteristicile clinice și biologice ale subiecților din cele două loturi, se regăsesc în tabelul I. Valorile au fost exprimate ca medii, deviații standard precum și procentual.

Tabelul I. Caracteristicile clinice și biologice ale subiecților din cele două loturi

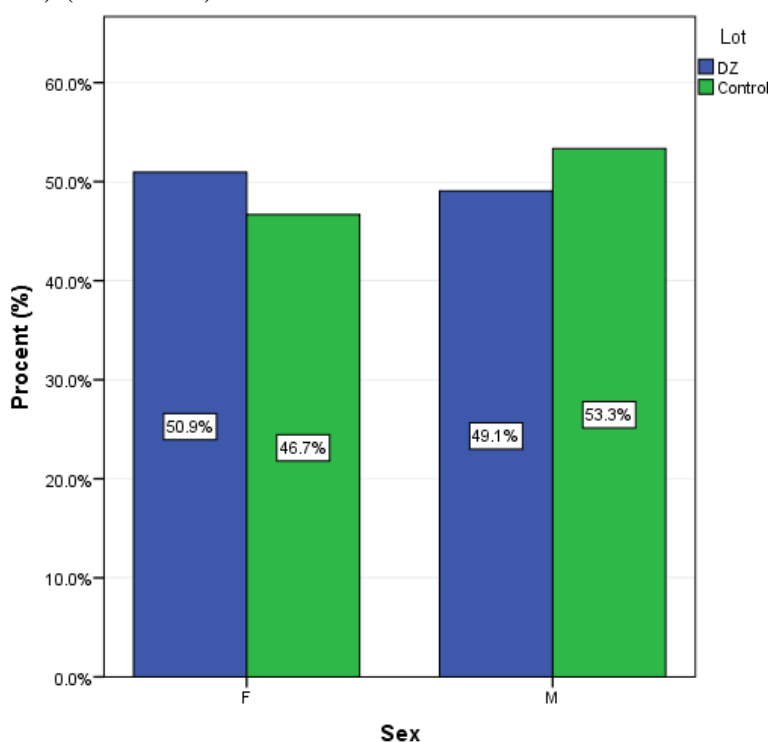
Caracteristicile clinice si biologice	Lot control		Lot pacienți diabetici		p
	Media +/- DS	N	Media +/- DS	N	
Număr de subiecți		30		53	
Vârsta (ani)	53,9 +/-11,48	30	60,7 +/-8,20	53	0,007
Sex (F) (%)	46,7	14	50,9	27	0,708
Istoric familial de boli metabolice (%)	66,7	20	71,7	38	0,631
Istoric familial de boală CVS (%)	60,0	18	60,0	32	0,973
Fumător (%)	20,0	6	24,5	13	0,637
Activitate fizică regulată (%)	36,7	11	34,0	18	0,804
Consum de alcool (%)	30,0	9	41,5	22	0,298
Vârsta la diagnostic (ani)			52,9 +/-9,31	53	
Durata bolii (ani)			7,7 +/-5,51	53	
IMC (kg/m ²)	27,9 +/-5,30	30	30,1 +/-4,57	53	0,063
Circumferința abdominală (cm)	99,7 +/-14,05	30	107,4 +/-12,78	53	0,013
Obezitate (%)	33,3	10	49,1	26	0,165
Obezitate abdominală (%)	60,0	18	90,6	48	0,001
Tratament doar dietă (%)			3,8	2	
Tratament cu ADO (%)			86,8	46	
Tratament cu insulină (%)			15,1	8	
Glicemie (mg/dl)	93,2 +/-14,40	30	148,8 +/-51,61	53	<0,001
HbA1C%	5,5 +/-0,33	30	7,3 +/-1,44	53	<0,001
Colesterol total (mg/dl)	197,5 +/-39,57	30	194,6 +/-49,02	53	0,783
LDLcoolesterol (mg/dl)	122,5 +/-36,16	30	115,7 +/-45,86	53	0,488
HDLcoolesterol (mg/dl)	52,2 +/-12,56	30	48,5 +/-12,66	53	0,203
Trigliceride (mg/dl)	114,3 +/-49,42	30	152,0 +/-57,78	53	0,003
Creatinină serică (mg/dl)	0,76 +/-0,17	30	0,85 +/-0,30	53	0,086
Acid uric (mg/dl)	5,4 +/-1,29	30	5,2 +/-1,22	53	0,597
RFG (ml/min/1,73mp)	96,8 +/-13,47	30	86,5 +/-21,41	53	0,009
Microalbuminurie >30mg/l	0,0	0	22,6	12	
Stadiul afectării renale					0,228
1 (%)	70	21	60,4	32	
2 (%)	30	9	26,4	14	
3A (%)	0	0	7,5	4	
3B (%)	0	0	5,7	3	
HTA (%)	56,7	17	83,0	44	0,009
TA sistolică (mmHg)	130,3 +/-15,19	30	144,7 +/-21,10	53	0,002
TA diastolică (mmHg)	75,3 +/-10,74	30	78,9 +/-10,74	53	0,139
Neuropatie autonomă CVS (%)			0,0	0	

Polineuropatie diabetică (%)			66,0	35	
Boală arterială periferică (%)			17,3	9	
Retinopatie diabetică (%)			17,0	9	
Boală CVS (%)	10,0	3	26,4	14	0,075
BCI (%)	20,0	6	47,2	25	0,014

N numărul pacienților, DS deviația standard

➤ **Distribuția subiecților în cele două loturi**

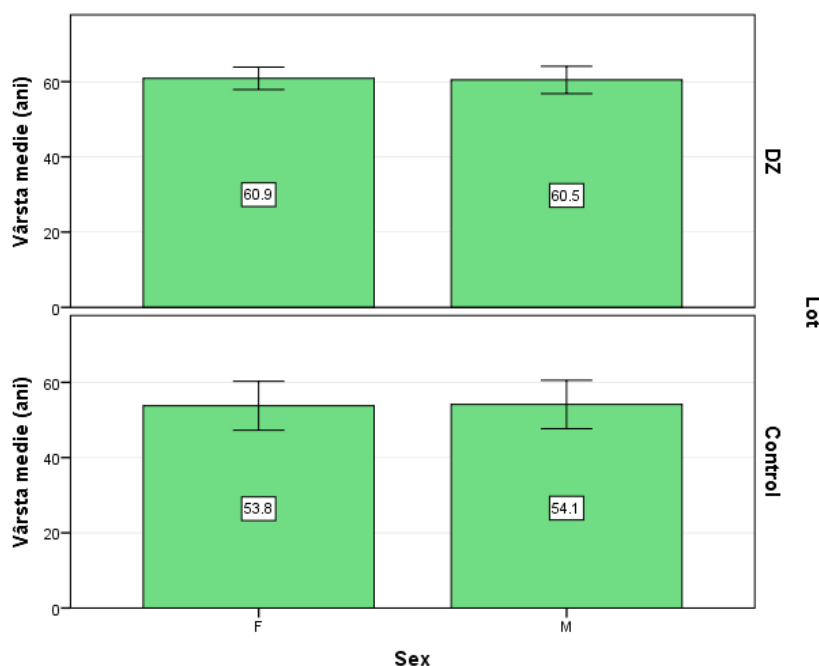
- În **lotul control** au fost incluse 14 femei (46,7%) și respectiv 16 bărbați (53,3%).
- În **lotul pacienților cu DZ tip 2** au fost incluse 27 de femei (50,9%) și 26 de bărbați (49,1%) (Graficul 1).



Graficul 1. Distribuția subiecților în funcție de sex în cele două loturi

➤ **Vârsta medie a subiecților** incluși în studiu a fost următoarea:

- În **lotul control**, **vârsta medie** a femeilor a fost de 53,79 ani \pm 11,240 DS, iar pentru bărbați de 54,13 ani \pm 12,055 DS.
- În **lotul pacienților cu DZ tip2** am observat că **vârsta medie** pentru femei a fost de 60,9 ani \pm 7,495 DS, iar pentru bărbați de 60,46 ani \pm 9,021 DS (Graficul 2).



Graficul 2. Vârsta medie (ani) a subiecților în cele două loturi

Din analiza parametrilor clinico-biologici ai subiecților incluși în cele două loturi am constatat următoarele:

- Pacienții cu DZ tip 2 au vârsta semnificativ mai crescută decât a celor din lotul control, $t(46,02)=2,82$, $p=0,007$.
- Din punct de vedere al distribuției pe sexe, cele două loturi sunt omogene ($p=0,708$).
- Pacienții cu DZ tip 2 au circumferința medie abdominală semnificativ mai crescută decât cea a subiecților din lotul control, $t(81)=2,54$, $p=0,013$.
- Pacienții cu DZ tip 2, comparativ cu lotul martor, prezintă semnificativ mai frecvent obezitate abdominală, $\chi^2(1)=10,98$, $p=0,001$. Pentru pacienții cu DZ tip 2 am obținut un RR pentru obezitate abdominală de 1,509 cu IC 95% (1,113; 2,047).
- Pacienții cu DZ tip 2 au valorile medii ale glicemiei semnificativ mai crescute decât lotul control, $t(65,07)=7,36$, $p<0,001$.
- Pacienții cu DZ tip 2 au valorile medii ale HbA1C% semnificativ mai crescute decât lotul control, $t(58,44)=7,72$, $p<0,001$.
- Pacienții cu DZ tip 2 au valorile medii ale trigliceridelor semnificativ mai crescute decât lotul control, $t(81)=3,01$, $p=0,003$.
- RFG este semnificativ mai redusă la pacienții cu DZ tip 2, comparativ cu lotul control, $t(80)=2,68$, $p=0,009$.
- Din punctul de vedere al stadializării afectării renale, nu am observat diferențe între cele două loturi, ($p=0,228$).
- Prevalența HTA este semnificativ mai crescută la pacienții diagnosticați cu DZ tip 2, comparativ cu lotul de control, $\chi^2(1)=6,82$, $p=0,009$. Pentru pacienții cu DZ tip 2 am obținut un RR pentru HTA de 1,465 cu IC 95% (1,047; 2,050).

- TA sistolică este semnificativ mai crescută la pacienții cu DZ tip 2, comparativ cu lotul control, $t(81)=3,27$, $p=0,002$.
- Prevalența BCI este semnificativ mai crescută la pacienții diagnosticați cu DZ tip 2, comparativ cu lotul de control, $\chi^2(1)=6,04$, $p=0,014$. Pentru pacienții cu DZ tip 2 am obținut un RR pentru BCI de 2,35 cu IC 95% (1,092; 5,095).

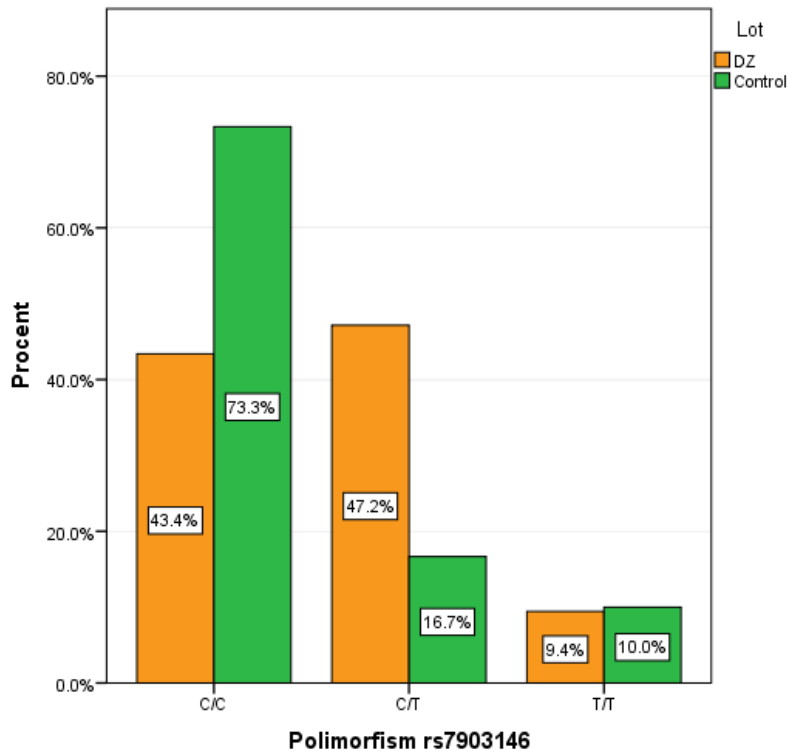
2. Analiza polimorfismelor rs7903146 și rs290487 ale genei TCF7L2 în loturile de studiu

În următoarea etapă, am analizat *frecvența genotipurilor C/C, C/T, T/T* pentru fiecare polimorfism studiat atât în lotul control cât și în lotul pacienților cu DZ tip 2.

2.1. Analiza polimorfismului rs7903146 al genei TCF7L2 în loturile de studiu

Pentru polimorfismul rs7903146 al genei TCF7L2 am observat următoarele (Graficul 3):

1. Frecvența *genotipului C/C* în lotul pacienților cu DZ tip 2 a fost de 43,4% (23 de pacienți), iar în lotul control de 73,3% (22 de subiecți).
2. Frecvența *genotipului C/T* în lotul pacienților cu DZ tip 2 a fost de 47,2% (25 de pacienți) și în lotul control de 16,7% (5 subiecți).
3. Frecvența *genotipului T/T* în lotul pacienților cu DZ tip 2 a fost de 9,4% (5 pacienți) și în lotul control de 10% (3 subiecți).

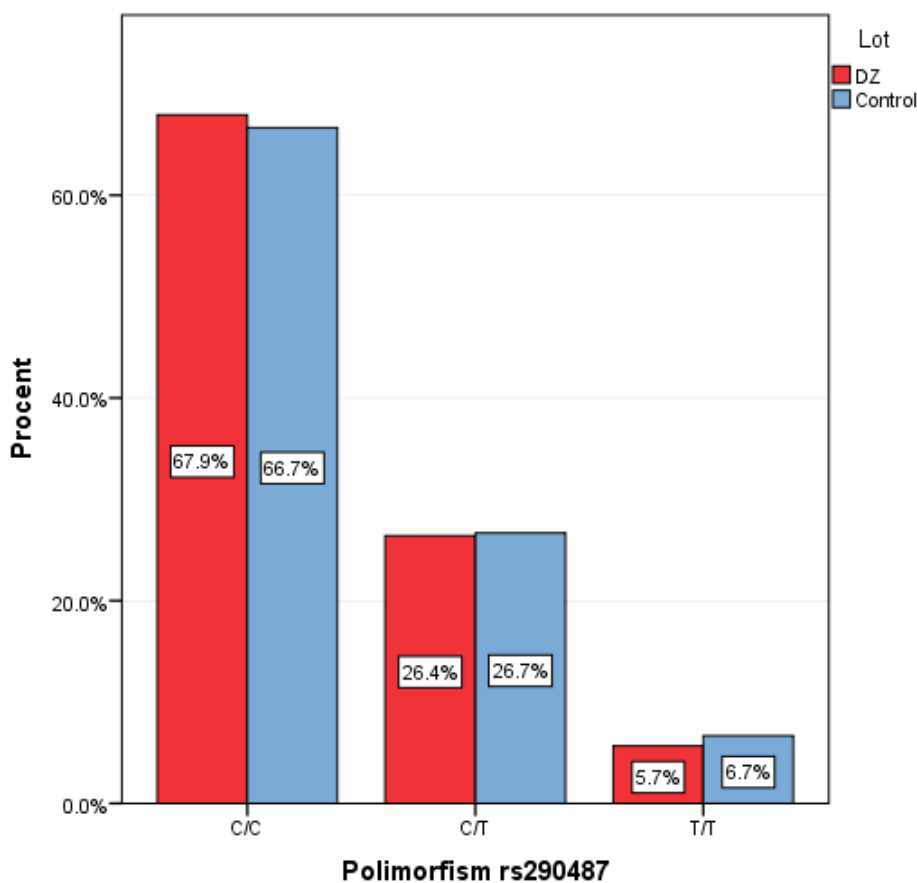


Graficul 3. Frecvența genotipurilor C/C, C/T, T/T pentru polimorfismul rs7903146 al genei TCF7L2 în lotul control și în lotul pacienților cu DZ tip 2.

2.2. Analiza polimorfismului rs290487 al genei TCF7L2 în loturile de studiu

Pentru polimorfismul rs290487 al genei TCF7L2 am observat următoarele (Graficul 4):

1. Frecvența *genotipului C/C* în lotul pacienților cu DZ tip 2 a fost de 67,9% (36 de pacienți), iar în lotul control de 66,7% (20 de subiecți).
2. Frecvența *genotipului C/T* în lotul pacienților cu DZ tip 2 a fost de 26,4% (14 de pacienți) și în lotul control de 26,7% (8 subiecți).
3. Frecvența *genotipului T/T* în lotul pacienților cu DZ tip 2 a fost de 5,7% (3 pacienți) și în lotul control 6,7% (2 subiecți).

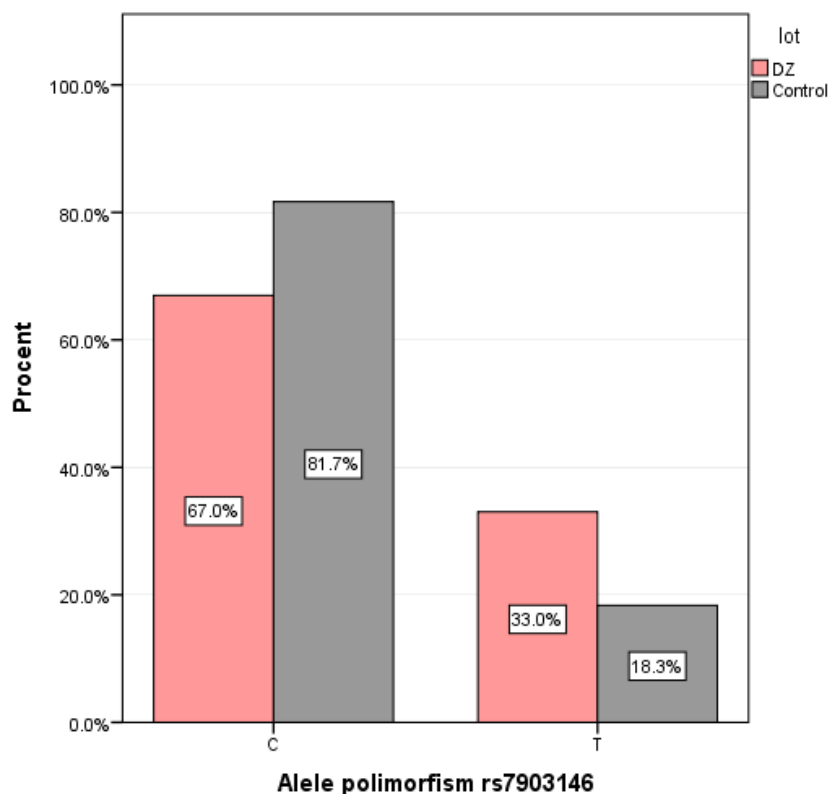


Graficul 4. Frecvența genotipurilor C/C, C/T, T/T pentru polimorfismul rs290487 al genei TCF7L2 în lotul control și în lotul pacienților cu DZ tip 2.

2.3. Analiza frecvenței alelei C și respectiv T pentru fiecare polimorfism în loturile de studiu

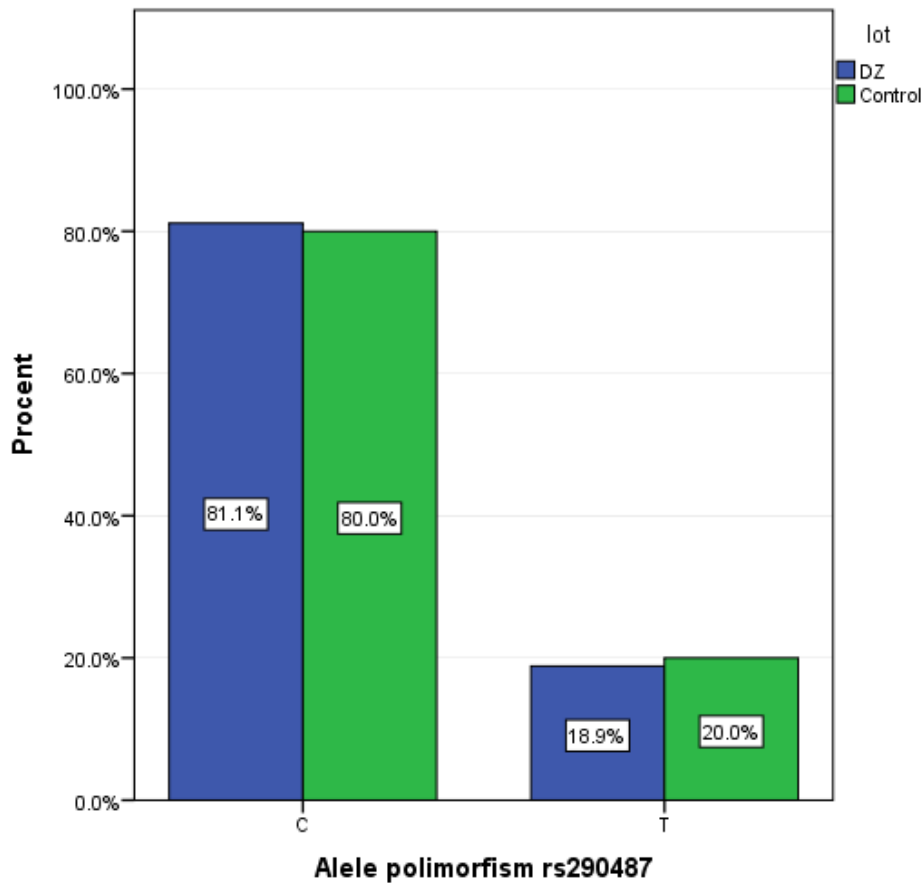
Am analizat *frecvența alelei C și respectiv T* pentru fiecare polimorfism în parte, în lotul control și în lotul pacienților cu DZ tip 2.

- 1) Pentru polimorfismul **rs7903146** al genei TCF7L2 analizând frecvența **alelei C** în cele două loturi am observat prezența acesteia la 72,3% din totalul subiecților, având o frecvență de 67,0% în lotul pacienților cu DZ tip 2 și o frecvență de 81,7% în lotul control. Pentru **alela T** am observat prezența acesteia la 27,7% din totalul subiecților, având o frecvență în lotul pacienților cu DZ tip 2 de 33% și de 18,3% în lotul control (Graficul 5).



Graficul 5. Frecvența alelei C și respectiv T pentru polimorfismul rs7903146 al genei TCF7L2 în lotul control și în lotul pacienților cu DZ tip 2.

- 2) Pentru polimorfismul **rs290487** al genei TCF7L2 analizând frecvența **alelei C** în cele două loturi am observat prezența acesteia la 74,7% din totalul subiecților, având o frecvență de 81,1% în lotul pacienților cu DZ tip 2 și o frecvență de 80% în lotul control. Pentru **alela T** am observat prezența acesteia la 19,3% din totalul subiecților, având o frecvență în lotul pacienților cu DZ tip 2 de 18,9% și de 20% în lotul control (Graficul 6).



Graficul 6. Frecvența alelei C și respectiv T pentru polimorfismul rs290487 al genei TCF7L2 în lotul control și în lotul pacienților cu DZ tip 2.

3. Analiza asocierii modelelor genetice cu DZ tip 2 în loturile de studiu

Am analizat dacă există o asocierie semnificativă statistic între diagnosticul de DZ tip 2 și prezența unui anumit model genetic (Tabelele II-V).

- Model dominant: C/C vs C/T+T/T,
- Model aditiv: C/C vs C/T vs T/T,
- Model recesiv: T/T vs C/C+C/T,
- Model co-dominant: C/T vs C/C+T/T,
- Model homozigot: C/C vs T/T,
- Model heterozigot: C/C vs C/T.

3.1. Pentru polimorfismul rs7903146 al genei TCF7L2 am analizat posibilitatea asocierii unui anumit model genetic cu prezența DZ tip 2 în lotul control și în cel al pacienților cu DZ tip 2 (Tabelele II-III).

Tabelul II. Genotipurile și frecvența alelelor pentru **polimorfismul rs7903146** al genei TCF7L2 în lotul control și în cel al pacienților cu DZ tip 2

Polimorfismul rs7903146	Total			Bărbați			Femei		
	Pacienți	Martor	p	Pacienți	Martor	p	Pacienți	Martor	p
Asociație			0,017			0,048			0,255
C/C	23 (43,4%)	22 (73,3%)		11 (42,3%)	12 (75,0%)		12 (44,4%)	10 (71,4%)	
C/T	25 (47,2%)	5 (16,7%)		13 (50,0%)	2 (12,5%)		12 (44,4%)	3 (21,4%)	
T/T	5 (9,4%)	3 (10,0%)		2 (7,7%)	2 (12,5%)		3 (11,1%)	1 (7,1%)	
Dominant			0,009			0,039			0,100
C/C	23 (43,4%)	22 (73,3%)		11 (42,3%)	12 (75,0%)		12 (44,4%)	10 (71,4%)	
C/T + T/T	30 (56,6%)	8 (26,7%)		15 (57,7%)	4 (25,0%)		15 (55,6%)	4 (28,6%)	
Recesiv			0,933			0,606			0,685
T/T	5 (9,4%)	3 (10,0%)		2 (7,7%)	2 (12,5%)		3 (11,1%)	1 (7,1%)	
C/C + C/T	48 (90,6%)	27 (90,0%)		24 (92,3%)	14 (87,5%)		24 (88,9%)	13 (92,9%)	
Co-dominant			0,005			0,014			0,147
C/T	25 (47,2%)	5 (16,7%)		13 (50,0%)	2 (12,5%)		12 (44,4%)	3 (21,4%)	
C/C + T/T	28 (52,8%)	25 (83,3%)		13 (50,0%)	14 (87,5%)		15 (55,6%)	11 (78,6%)	
Homozigot			0,552			0,936			0,446
C/C	23 (82,1%)	22 (88,0%)		11 (84,6%)	12 (85,7%)		12 (80,0%)	10 (90,9%)	
T/T	5 (17,9%)	3 (12,0%)		2 (15,4%)	2 (14,3%)		3 (20,0%)	1 (9,1%)	
Heterozigot			0,004			0,015			0,111
C/C	23 (47,9%)	22 (81,5%)		11 (45,8%)	12 (85,7%)		12 (50,0%)	10 (76,9%)	
C/T	25 (52,1%)	5 (18,5%)		13 (54,2%)	2 (14,3%)		12 (50,0%)	3 (23,1%)	
Alele			0,042			0,164			0,139
C	71(67,0%)	49(81,7%)		35(67,3%)	26(81,3%)		36(66,7%)	23(82,1%)	
T	35(33,0%)	11 (18,3%)		17(32,7%)	6(18,8%)		18(33,3%)	5(17,9%)	

Tabelul III. Analiza modelelor genetice și frecvenței alelelor pentru **polimorfismul rs7903146** al genei TCF7L2 în lotul control și în cel al pacienților cu DZ tip 2

Model genetic Polimorfism rs7903146	OR (IC95%)	Chi-pătrat	Grade de libertate	p
Asociație (C/C vs C/T vs T/T)			2	0,017
Dominant (C/T+T/T vs C/C)	3,587 (1,354-9,506)	6,91	1	0,009
Recesiv (T/T vs C/T+C/C)	0,943 (0,208-4,231)	0,07	1	0,933
Co-dominant (C/T vs C/C+T/T)	4,464 (1,484-3,429)	7,723	1	0,005
Homozigot (C/C vs T/T)	0,627 (0,134-2,944)	0,354	1	0,552
Heterozigot (C/C vs C/T)	0,209 (0,068-0,643)	8,111	1	0,004
Alele (C vs T)	0,455 (0,211-0,983)	4,125	1	0,042

- Pentru **polimorfismul rs7903146** am observat diferențe semnificative ale **frecvenței combinațiilor alelice între cele 2 loturi**, $\chi^2(2)=8,1$, $p=0,017$.
- Am observat o asociere semnificativă între **diagnosticul de DZ tip 2** și prezența genotipului (C/T+ T/T) comparativ cu genotipul C/C (**modelul dominant**), OR=3,587, IC95% = (1,354-9,506), $\chi^2(1)=6,91$, $p=0,009$.
- Nu am observat o asociere semnificativă între prezența diagnosticului de DZ tip 2 când am comparat polimorfismul T/T cu C/T+C/C (modelul recesiv), $p=0,933$.
- Am observat o asociere semnificativă între **diagnosticul de DZ tip 2** și prezența genotipului C/T comparativ cu genotipul (C/C+ T/T) (**modelul co-dominant**), OR=4,464, IC95% = (1,484-13,429), $\chi^2(1)=7,72$, $p=0,005$.
- Nu am observat o asociere semnificativă între prezența diagnosticului de DZ tip 2 când am comparat genotipul T/T cu C/C (modelul homozigot), $p=0,552$.
- Am observat o asociere semnificativă între **diagnosticul de DZ tip 2** și prezența genotipului C/C vs C/T (**modelul heterozigot**), OR=0,209, IC95%= (0,068-0,643), $\chi^2(1)=8,11$, $p=0,004$.
- Am observat o asociere semnificativă între **diagnosticul de DZ tip 2** și frecvența alelelor T comparativ cu frecvența alelelor C, OR=0,455, IC95%=(0,211-0,983), $\chi^2(1)=4,12$, $p=0,042$. Pentru că OR este subunitar, concluzionăm că **alela C are rol protectiv pentru riscul de diabet zaharat tip 2**.

3.2. Pentru **polimorfismul rs290487** al genei TCF7L2 am analizat posibilitatea asocierii unui anumit model genetic cu prezența DZ tip 2 în lotul control și în cel al pacienților diabetici (Tabelele IV,V).

Tabelul IV. Genotipurile și frecvența alelelor pentru **polimorfismul rs290487** al genei TCF7L2 în lotul control și în cel al pacienților cu DZ tip 2

Polimorfism rs290487	Total			Bărbați			Femei		
	Pacienți	Martor	p	Pacienți	Martor	p	Pacienți	Martor	p
Asociație									
C/C	36 (67,9%)	20 (66,7%)	0,982	13 (50,0%)	11 (68,8%)	0,487	23 (85,2%)	9 (64,3%)	0,188
C/T	14 (26,4%)	8 (26,7%)		10 (38,5%)	4 (25,0%)		4 (14,8%)	4 (28,6%)	
T/T	3 (5,7%)	2 (6,7%)		3 (11,5%)	1 (6,3%)		0 (00,0%)	1 (7,1%)	
Dominant									
C/C	36 (67,9%)	20 (66,7%)	0,906	13 (50,0%)	11 (68,8%)	0,233	23 (85,2%)	9 (64,3%)	0,125
C/T + T/T	17 (32,1%)	10 (33,3%)		13 (50,0%)	5 (31,3%)		4 (14,8%)	5 (35,7%)	
Recesiv									
T/T	3 (5,7%)	2 (6,7%)	0,853	3 (11,5%)	1 (6,3%)	0,571	0 (00,0%)	1 (7,1%)	0,160
C/C + C/T	50 (94,3%)	28 (93,3%)		23 (88,5%)	15 (93,8%)		27 (100%)	13 (92,9%)	
Co-dominant									
C/T	14 (26,4%)	8 (26,7%)	0,980	10 (38,5%)	4 (25,0%)	0,369	4 (14,8%)	4 (28,6%)	0,292
C/C + T/T	39 (73,6%)	22 (73,3%)		16 (61,5%)	12 (75,0%)		23 (85,2%)	10 (71,4%)	
Homozigot									
C/C	36 (92,3%)	20 (90,9%)	0,848	13 (81,3%)	11 (91,7%)	0,436	23 (100%)	9 (90,0%)	0,124
T/T	3 (7,7%)	2 (9,1%)		3 (18,8%)	1 (8,3%)		0 (00,0%)	1 (10,0%)	
Heterozigot									
C/C	36 (72,0%)	20 (71,4%)	0,957	13 (56,5%)	11 (73,3%)	0,294	23 (85,2%)	9 (64,3%)	0,237
C/T	14 (28,0%)	8 (28,6%)		10 (43,5%)	4 (26,7%)		4 (14,8%)	4 (30,8%)	
Alele									
C	86 (81,1%)	48(80,0%)	0,859	36(69,2%)	26(81,3%)	0,224	50(92,6%)	22(78,6%)	0,066
T	20(18,9%)	12(20,0%)		16(30,8%)	6(18,8%)		4(7,4%)	6(21,4%)	

Tabelul V. Analiza modelelor genetice și frecvenței alelelor pentru **polimorfismul rs290487 al genei TCF7L2** în lotul control și în cel al pacienților cu DZ tip 2

Model genetic Polimorfism rs290487	OR (IC95%)	Chi-pătrat	Grade de libertate	p
Asociație (C/C vs C/T vs T/T)			2	0,982
Dominant (C/T+T/T vs C/C)	0,944 (0,364-2,450)	0,014	1	0,906
Recesiv (T/T vs C/T+C/C)	0,840 (0,132-5,332)	0,034	1	0,853
Co-dominant (C/T vs C/C+T/T)	0,987 (0,358-2,721)	0,001	1	0,980
Homozigot (C/C vs T/T)	1,200 (0,185-7,792)	0,037	1	0,848
Heterozigot (C/C vs C/T)	1,029 (0,369-2,871)	0,003	1	0,957
Alele (C vs T)	1,075 (0,484-2,388)	0,032	1	0,859

- Pentru **polimorfismul rs290487** nu am observat diferențe semnificative ale frecvenței combinațiilor alelice între cele 2 loturi, $p=0,982$.
- Nu am observat o asociere semnificativă între **diagnosticul de DZ tip 2** și prezența genotipului (C/T+ T/T) comparativ cu genotipul C/C (**modelul dominant**), $p=0,906$.
- Nu am observat o asociere semnificativă între prezența **diagnosticului de DZ tip 2** când am comparat genotipul T/T cu genotipul (C/T+C/C) (**modelul recesiv**), $p=0,853$.
- Nu am observat o asociere semnificativă între **diagnosticul de DZ tip 2** și prezența genotipului C/T comparativ cu genotipul (C/C+T/T) (**modelul co-dominant**), $p=0,980$.
- De asemenea, nu am observat o asociere semnificativă între prezența **diagnosticului de DZ tip 2** când am comparat genotipul T/T cu C/C (**modelul homozigot**), $p=0,848$.
- Nu am observat o asociere semnificativă între **diagnosticul de DZ tip 2** și prezența genotipului C/C comparativ cu genotipul C/T (**modelul heterozigot**), $p=0,957$.
- Nu am observat o asociere semnificativă între **diagnosticul de DZ tip 2** și frecvența **alelelor C** comparativ cu frecvența alelelor T, $p=0,859$.

4. Predicția riscului de DZ tip 2 în funcție de polimorfism pentru cele două loturi

4.1. Predicția riscului DZ tip 2 pentru polimorfismul rs7903146 al genei TCF7L2 pentru cele două loturi (Tabelul VI)

Tabelul VI. Predicția riscului de DZ tip 2 pentru polimorfismul rs7903146 al genei TCF7L2 pentru cele două loturi

	DZ tip 2 (n=53)	Control (n=30)	p	OR (IC 95%)
Genotip				
C/C	23(43,4%)	22 (73,3%)	0,026	1
C/T	25 (47,2%)	5 (16,7%)		5,137 (1,558; 16,939) / 0,007
T/T	5 (9,4%)	3 (10,0%)		1,194 (0,229; 6,229) / 0,833
Modelul aditiv				
C/C	23 (82,1%)	22 (88,0%)	0,550	1,594 (0,340; 7,482) / 0,554
T/T	5 (27,9 %)	3 (12,0 %)		1
Modelul recesiv				
C/C-C/T	48 (90,6%)	27 (90,0%)	0,933	1,067 (0,236; 4,814) / 0,933
T/T	5 (9,4%)	3 (10,0%)		1
Modelul dominant				
C/C	23 (43,4%)	22 (73,3%)	0,008	3,587 (1,354; 9,506) / 0,010
C/T-T/T	30 (56,6%)	8 (26,7 %)		1

- Am aplicat regresia logistică cu scopul de a prezice prezența diagnosticului de DZ tip 2, plecând de la genotipul polimorfismului rs7903146 și controlând variabilele de vârstă și sex. Modelul final a conținut 3 variabile și este semnificativ statistic, $\chi^2(4, N=83)=17,54$, $p=0,002$, indicând că modelul propus poate face distincție între persoanele diagnosticate sau nu cu DZ tip 2. Controlând efectele vârstei și sexului, modelul explică între 19,1%-26,1% din varianța prezenței diagnosticului de DZ tip 2 și clasifică corect 71,1% din cazuri. **Polimorfismul genetic rs7903146 este predictiv pentru diagnosticul de DZ tip 2, $p=0,026$.** Comparativ cu persoanele cu genotip C/C, cei cu genotip C/T au de 5,13 ori mai multe șanse de a prezenta DZ tip 2, când celelalte variabile din model se păstrează constante. În schimb, nu am observat diferențe între prezența genotipului T/T și C/C în ceea ce privește capacitatea predictivă a DZ tip 2, $p=0,833$.
- Nu am putut construi un model predictiv plecând de la **modelul aditiv al rs7903146**, $p=0,550$ sau de la **modelul recesiv al rs7903146**, $p=0,933$.
- Am aplicat regresia logistică cu scopul de a prezice prezența diagnosticului de DZ tip 2, plecând de la **modelul dominant al polimorfismului rs7903146**. Modelul final este semnificativ statistic, $\chi^2(1, N=83)=7,13$, $p=0,008$, indicând că modelul propus poate face distincție între persoanele diagnosticate sau nu cu DZ tip 2. Modelul explică între 8,2%-11,3% din varianța prezenței diagnosticului de DZ tip 2 și clasifică corect 63,9% din cazuri. **Modelul dominant rs7903146 este predictiv pentru diagnosticul de DZ tip 2, $p=0,010$.** Comparativ cu persoanele cu genotip C/C, cei

cu genotip C/T + T/T au de 3,58 ori mai multe șanse de a prezenta DZ tip 2, când celelalte variabile din model se păstrează constante.

4.2. Predicția riscului de DZ tip 2 pentru polimorfismul rs290487 al genei TCF7L2 pentru cele două loturi (Tabelul VII)

Tabelul VII. Predicția riscului de DZ tip 2 pentru polimorfismul rs290487 al genei TCF7L2 pentru cele două loturi

	DZ tip 2 (n=53)	Control (n=30)	p	OR (IC 95%)
Genotip				
C/C	36 (67,9%)	20(66,7%)	0,836	1
C/T	14 (26,4%)	8 (26,7%)		1,411 (0,444 ; 4,481) /0,559
T/T	3 (5,7%)	2 (6,7%)		1,242 0(0,172; 8,983) / 0,830
Modelul aditiv				
C/C	36(92,3 %)	20(90,9 %)	0,849	0,833 (0,128; 5,411)/ 0,849
T/T	3 (7,7%)	2 (9,1%)		1
Modelul recesiv				
C/C-C/T	50 (94,3 %)	28(93,3%)	0,854	1,190 (0,188; 7,556) / 0,853
T/T	3 (5,7%)	2 (6,7%)		1
Modelul dominant				
C/C	36 (67,9%)	20(66,7%)	0,907	1,059 (0,408; 2,747) / 0,906
C/T-T/T	17(32,1 %)	10(33,3%)		1

- Plecând de la genotipul polimorfismului rs290487 nu am putut crea o predicție a diagnosticului de DZ tip 2, $p=0,836$.
- Nu am putut construi un model predictiv plecând de la **modelul aditiv** al rs290487, $p=0,849$.
- Nu am putut construi un model predictiv plecând de la **modelul recesiv** al rs290487, $p=0,854$.
- Nu am putut construi un model predictiv plecând de la **modelul dominant** al rs290487, $p=0,907$.

5. Analiza caracteristicilor clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi în funcție de genotipurile polimorfismelor rs7903146 și rs290487 ale genei TCF7L2

5.1. Analiza caracteristicilor clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi în funcție de genotipurile polimorfismului rs7903146 al genei TCF7L2 (Tabelul VIII).

Tabelul VIII. Analiza caracteristicilor clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi în funcție de genotipurile polimorfismului rs7903146 al genei TCF7L2

Parametru	Lot	Genotip C/C	Genotip C/T	Genotip T/T	Total	p	p interacțiune
		Media+/- DS	Media+/- DS	Media+/- DS	Media +/- DS		
Vârsta (ani)	DZ	61,13 +/- 8,546	59,08 +/- 8,195	66,60 +/- 2,966	60,68 +/- 8,201	0,164	0,449
	Control	53,55 +/- 11,079	56,20 +/- 15,255	53,33 +/- 11,930	53,97 +/- 11,482	0,899	
Vârsta la diagnostic (ani)	DZ	52,935 +/- 10,1828	51,824 +/- 9,1209	58,800 +/- 2,8636	52,964 +/- 9,3164	0,317	-
Durata bolii (ani)	DZ	8,196 +/- 6,4645	7,336 +/- 4,9161	7,800 +/- 4,2071	7,753 +/- 5,5106	0,869	-
IMC (kg/m ²)	DZ	31,27 +/- 4,90	29,69 +/- 4,26	26,22 +/- 1,86	30,05 +/- 4,57	0,068	0,240
	Control	27,85 +/- 5,35	27,74 +/- 6,64	29,22 +/- 3,84	27,96 +/- 5,30	0,915	
Obezitate (%)	DZ	56,5	52,0	0,00	50,9 %	0,057	0,158
	Control	31,8	40,0	33,3	100 %	0,942	
Obezitate abdominală (%)	DZ	91,3	92,0	80,0	90,6 %	0,721	0,159
	Control	54,5	80,0	66,7	100 %	0,570	
Glicemie (mg/dl)	DZ	142,60 +/- 40,84	159,17 +/- 61,09	126,18 +/- 39,03	148,86 +/- 51,61	0,322	0,548
	Control	92,67 +/- 13,55	92,00 +/- 16,20	99,20 +/- 22,15	93,21 +/- 14,39	0,760	
HbA1C% (%)	DZ	7,07 +/- 1,07	7,43 +/- 1,78	7,08 +/- 1,05	7,24 +/- 1,44	0,675	0,975
	Control	5,46 +/- 0,40	5,60 +/- 0,26	5,50 +/- 0	5,51 +/- 0,33	0,882	

Colesterol total (mg/dl)	DZ	185,43 +/- 42,33	208,51 +/- 54,86	167,35 +/- 26,49	194,61 +/- 49,02	0,112	0,215
	Control	195,44 +/- 37,25	192,31 +/- 55,08	221,26 +/- 33,16	197,50 +/- 39,57	0,588	
LDL-Colesterol (mg/dl)	DZ	106,00 +/- 37,55	129,60 +/- 51,88	91,00 +/- 30,39	115,72 +/- 45,86	0,090	0,186
	Control	119,91 +/- 31,39	118,60 +/- 54,93	148,00 +/- 38,58	122,50 +/- 36,16	0,451	
HDL-Colesterol (mg/dl)	DZ	47,51 +/- 14,37	48,95 +/- 11,69	50,69 +/- 10,78	48,49 +/- 12,66	0,857	0,632
	Control	53,32 +/- 12,93	48,88 +/- 8,50	49,53 +/- 18,28	52,20 +/- 12,56	0,733	
Trigliceride (mg/dl)	DZ	159,56 +/- 61,35	149,75 +/- 55,50	128,79 +/- 56,39	152,03 +/- 57,78	0,547	0,599
	Control	111,44 +/- 52,26	124,18 +/- 53,09	118,36 +/- 27,10	114,26 +/- 49,41	0,872	
RFG (ml/min/1,73 m²)	DZ	86,95 +/- 22,151	92,24 +/- 17,001	78,4 +/- 19,92	88,74 +/- 19,562	0,313	0,876
	Control	97,14 +/- 12,08	98,4 +/- 18,569	92 +/- 19,157	96,83 +/- 13,47	0,804	
Microalbuminurie >30mg/l (%)	DZ	21,7	20,0	40,0	22,6 %	0,598	-
Polineuropatie diabetică (%)	DZ	60,9	72,0	60,0	66,0%	0,675	-
Retinopatie diabetică (%)	DZ	13,0	20,0	20,0	17,0 %	0,905	-

Nu am observat o asociere semnificativă statistic între caracteristicile clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi și genotipurile polimorfismului rs7903146 al genei TCF7L2.

5.2. Analiza caracteristicilor clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi în funcție de genotipurile polimorfismului rs290487 al genei TCF7L2 (Tabelul IX).

Tabelul IX. Analiza caracteristicilor clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi în funcție de genotipurile polimorfismului rs290487 al genei TCF7L2

Parametru	Lot	Genotip C/C	Genotip C/T	Genotip T/T	Total	p	p interacțiune
		Media+/- DS	Media+/- DS	Media+/- DS	Media+/- DS		
Vârsta (ani)	DZ	60,97+/- 8,378	60,71+/- 7,436	57,00+/- 11,790	60,68+/- 8,201	0,730	0,099
	Control	57,15+/- 9,615	46,38+/- 14,071	52,50+/- 3,536	53,97+/- 11,482	0,075	
Vârsta la diagnostic (ani)	DZ	8,12+/- 5,892	6,31+/- 4,513	10,00+/- 5,000	7,75+/- 5,510	0,454	-
Durata bolii (ani)	DZ	52,90+/- 9,802	54,40+/- 8,397	47,00+/- 7,000	52,96+/- 9,316	0,466	-
IMC (kg/m ²)	DZ	29,5+/- 4,06+/-	31,7+/- 5,74+/-	28,6+/- 3,71+/-	30,1+/- 4,57+/-	0,282	0,045
	Control	26,1+/- 3,90	30,5+/- 4,34	36,1+/- 11,88	27,9+/- 5,30	0,007	
Obezitate (%)	DZ	47,2%	57,1%	33,3%	49,1%	0,701	0,221
	Control	20,00%	62,50%	50,00%	33,30%	0,086	
Obezitate abdominală (%)	DZ	88,90%	92,90%	100,00%	90,60%	0,772	0,950
	Control	60,00%	62,50%	50,00%	60,00%	0,949	
Glicemie (mg/dl)	DZ	149,350+/- 43,1806	153,807+/- 72,2247	120,033+/- 36,0106	148,868+/- 51,6107	0,595	0,832
	Control	93,590+/- 16,2338	93,963+/- 11,0366	86,500+/- 7,3539	93,217+/- 14,3976	0,802	
HbA1C% (%)	DZ	7,211+/- 1,0474	7,486+/- 2,2620	6,567+/- 0,8083	7,247+/- 1,4442	0,595	0,780
	Control	5,617+/- 0,1941	5,300+/- 0,5568	5,500+/- 0	5,510+/- 0,3348	0,460	
Colesterol total (mg/dl)	DZ	190,1608+/- 39,27184	212,6507+/- 69,49723	163,9033+/- 7,47323	194,6153+/- 49,02463	0,187	0,242

	Control	205,5975+/- 40,67194	190,1000+/- 28,88337	146,1950+/- 33,53807	197,5047+/- 39,57026	0,104	
LDL Colesterol (mg/dl)	DZ	109,22+/- 36,484	136,71+/- 64,063	95,67+/- 16,442	115,72+/- 45,863	0,120	0,157
	Control	129,00+/- 38,575	114,50+/- 27,229	89,50+/- 30,406	122,50+/- 36,161	0,267	
HDL Colesterol (mg/dl)	DZ	49,3136+/- 14,19375	46,9250+/- 9,42924	46,0000+/- 5,55608	48,4951+/- 12,66892	0,792	0,562
	Control	53,5800+/- 13,09763	52,3388+/- 10,72293	37,8700+/- 7,87717	52,2017+/- 12,56057	0,248	
Trigliceride (mg/dl)	DZ	158,3992+/- 60,46391	144,4864+/- 46,37629	110,9133+/- 72,01112	152,0362+/- 57,78205	0,340	0,800
	Control	115,4085+/- 53,68822	116,2788+/- 45,63260	94,7350+/- 25,57605	114,2623+/- 49,41659	0,842	
RFG (ml/min/1,73 m²)	DZ	87,61+/- 21,452	88,14+/- 15,155	104,00+/- 12,124	88,74+/- 19,562	0,385	0,744
	Control	94,45+/- 11,980	100,75+/- 17,515	105,00+/- 4,243	96,83+/- 13,470	0,374	
Microalbuminurie >30mg/l (%)	DZ	19,4%	21,4%	66,7%	22,6%	0,170	-
Polineuropatie diabetică (%)	DZ	61,10%	71,40%	100,00%	66,00%	0,348	-
Retinopatie diabetică (%)	DZ	19,40%	7,10%	33,30%	17,00%	0,431	-

Nu am observat diferențe semnificative între genotipurile rs290487 ale genei TCF712 și caracteristicile clinico-biologice ale subiecților din cele loturi cu excepția BMI-ului.

Analizând complicațiile cronice ale DZ tip 2 nu am observat o asocieră semnificativă între genotipurile fiecărui polimorfism studiat și complicațiile micro și macrovasculare ale DZ tip 2.

6. Analiza relației dintre factorii de risc și genotipurile celor două polimorfisme pentru ambele loturi studiate

Tabelul X. Analiza relației dintre factorii de risc și genotipurile polimorfismului **rs7903146** al genei TCF7L2 pentru cele două loturi

Factor de risc	Lot	Genotip C/C (%)	Genotip C/T (%)	Genotip T/T (%)	Total (%)	p	p interacțiune
Fumat	DZ	21,7	28,0	20,3	24,5	0,854	0,788
	Control	18,2	20,0	33,3	20,0	0,827	
Activitate fizică regulată	DZ	34,8	28,0	60,0	34,0	0,384	0,488
	Control	45,5	20,0	0,0	36,7	0,216	
Consum de alcool	DZ	39,1	48,0	20,0	41,5	0,487	0,594
	Control	31,8	20,0	33,3	30,0	0,866	

Tabelul XI. Analiza relației dintre factorii de risc și genotipurile polimorfismului **rs290487** al TCF7L2 pentru cele două loturi

Factor de risc	Lot	Genotip C/C (%)	Genotip C/T (%)	Genotip T/T (%)	Total (%)	p	p interacțiune
Fumat	DZ	25,0	28,6	0	24,5	0,576	0,986
	Control	20,0	12,5	50,0	20,0	0,495	
Activitate fizică regulată	DZ	36,1	21,4	66,7	34,0	0,289	0,675
	Control	40,0	37,5	0,0	36,7	0,534	
Consum de alcool	DZ	36,1	50,0	66,7	41,5	0,443	0,557
	Control	35,0	12,5	50,0	30,0	0,409	

Analizând relația dintre factorii de risc precum fumatul, sedentarismul și consumul de alcool, nu am observat o asociere semnificativă între aceștia și genotipurile celor două polimorfisme studiate.

CAPITOLUL V

DISCUȚII

ORIGINALITATEA LUCRĂRII

CONCLUZII

DISCUȚII

DZ de tip 2 este o boală care se caracterizează prin incapacitatea celulelor beta pancreatice de a crește secreția de insulină pentru a compensa rezistența la insulină în țesuturile periferice și în a cărei patogenie factorii genetici joacă un rol important.

Câteva dintre polimorfismele genei TCF7L2 se asociază cu un risc crescut de a dezvolta DZ tip 2. Polimorfismele **rs7903146** și **rs290487** sunt două dintre polimorfismele genei TCF7L2 pentru care s-a demonstrat asocierea cu DZ tip 2 în câteva grupuri etnice.

În lucrarea de față am analizat pentru prima dată în țara noastră asocierea dintre polimorfismele **rs7903146** și **rs290487** ale genei TCF7L2 și riscul apariției DZ tip 2 într-un subgrup populațional din Sud-Estul României.

Pentru analiza genetică s-a utilizat secvențierea directă a ADN-ului genomic, prin metoda pirosecvențierii, o tehnologie unică de detecție bazată pe principiul secvențierii prin sinteză, care furnizează date cantitative în timp real fără necesitatea utilizării gelurilor, sondelor sau marcării.

Pe lângă caracterizarea SNP, inserțiilor sau delețiilor și a secvențelor necunoscute, pirosecvențierea poate cuantifica frecvența alelelor și nivelele de metilare la situsuri CpG și non-CpG (CpN).

Integrând detecția și cuantificarea variantelor genetice, platforma Pyromark reduce costurile și timpul necesar comparativ cu analiza prin PCR urmată de analiza pe gel.

Principalul avantaj al utilizării pirosecvențierii în cazul polimorfismelor genei TCF7L2 a fost faptul că în zona respectivă nu există un situs pentru o enzimă de restricție.

În articolele care utilizau analiza prin PCR (49), unul dintre primeri prezenta o mutație, urmând ca la pacienții care prezentau polimorfismul să se creeze un situs pentru enzima respectivă de restricție, dacă mutația era inserată prin PCR. Această abordare nu era corectă de aceea am folosit primeri fără mutații și am secvențiat regiunea respectivă.

Analiza realizată pentru polimorfismul **rs7903146** al genei TCF7L2 a demonstrat că există o asociere semnificativă între frecvența alelei minore T și DZ tip 2, alela C având un rol protector. De asemenea, am observat că în cazul polimorfismului **rs7903146** modelul *dominant* este predictiv pentru DZ tip 2. Indivizii cu *genotipul C/T+T/T* comparându-i cu cei cu *genotipul C/C* au șanse de 3,58 de ori mai mari de a dezvolta DZ tip 2 atunci când celelalte variabile sunt constante în modelul analizat. Astfel, putem considera că polimorfismul **rs7903146** al genei TCF7L2 este predictiv pentru DZ tip 2 în populația României.

Rezultatele pe care le-am obținut sunt în concordanță cu rezultatele studiului lui Lyssenko *et al.* care a raportat o asociere semnificativă între *genotipul CT/TT* al polimorfismului **rs7903146** și riscul de DZ tip 2 în două cohorte independente (56).

De asemenea, și meta-analiza realizată de către Song *et al.* analizând 66 de studii a raportat asocierea dintre polimorfismul **rs7903146** și DZ tip 2. Autorii au observat o diferență semnificativă între frecvența alelei minore T în diferite populații, existând o frecvență mai

mare la caucazieni, africani și hispanici (0,16-0,48%) și mult mai puțin frecventă în populația din Asia de Est (0,02-0,04%) (57).

În anul 2013, Peng *et al.* a realizat o meta-analiză care a cuprins 60 de studii în care a urmărit asocierea dintre polimorfismul **rs7903146** și riscul apariției DZ tip 2. Din total acestora, 42 de studii au raportat o asociere semnificativă între acest polimorfism și riscul de DZ tip 2 cu excepția unor grupuri etnice precum indienii americani Pima, mexicanii și brazilienii (24).

Totuși, studiul lui Barra *et al.* din anul 2012 a raportat într-un grup populațional din regiunea centrală a Braziliei o asociere semnificativă între **genotipul T/T** al **rs7903146** și riscul de DZ tip 2 (58).

În ceea ce privește **polimorfismul rs290487** nu am observat diferențe semnificative ale frecvenței combinațiilor alelice între cele două loturi. De asemenea, nu am observat o asociere semnificativă între diagnosticul de DZ tip 2 și prezența vreunui model genetic pentru **polimorfismul rs290487**, $p > 0,05$, rezultatele fiind similare cu cele raportate și de către alți autori cum ar fi Chang Y.C. *et al.* precum și cele prezentate în meta-analiza realizată de către Peng *et al.* (24,25,31,32).

Totuși există însă studii care demonstrează existența unei asocieri semnificative între prezența **polimorfismului rs290487** și riscul de DZ tip 2 (27,29,49,59).

Studiile realizate de către Ren Q. *et al.* în anul 2008 (29) pe populația chineză, Pi-Hua Liu *et al.* (27) realizat în anul 2009 pe adolescenți taiwanezi și tineri caucazieni, Wang J. *et al.* (49) în anul 2013 pe populația chineză din regiunea Han și studiul lui Shokouhi S. *et al.* (59) din anul 2014 pe un grup etnic Kurd au demonstrat existența unei asocieri semnificative între prezența polimorfismului rs290487 al genei TCF7L2 și riscul de DZ tip 2.

Plecând de la **polimorfismului rs290487** nu am putut crea o predicție a diagnosticului de DZ tip 2 pentru niciun model genetic.

De asemenea, nu am observat o asociere între caracteristicile clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi și genotipurile **polimorfismului rs7903146** al genei TCF7L2. Mai mult, nu am observat diferențe semnificative între **genotipurile polimorfismului rs290487** al genei TCF7L2 și caracteristicile clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi cu excepția IMC-ului. Rezultate similare referitoare la asocierea celor două polimorfisme și caracteristicile clinico-biologice ale subiecților au fost raportate și de către alte studii cum ar fi și cel condus de către Wang J. *et al.* realizat în anul 2013 pe o populație chineză din regiunea Han (49).

Studii recente realizate de către Buraczynska M. *et al.* (60), Ciccacci C. *et al.* (61), Muendlein A. *et al.* (62) au demonstrat faptul că prezența **alelei minore T** a **polimorfismului rs7903146** este asociată cu prezența complicațiilor cronice ale DZ tip 2 cum ar fi neuropatia, nefropatia diabetică, retinopatia diabetică și boala cardio-vasculară.

Buraczynska M. *et al.* a observat că **alela T** a **polimorfismului rs7903146** s-a asociat puternic cu nefropatia recent după debutul diabetului zaharat (60).

Muendlein A. *et al.* a analizat asocierea dintre **polimorfismul rs7903146** și modificările angiografice ale bolii coronariene la pacienții diabetici și non-diabetici într-un studiu realizat pe populația caucaziană din Austria și a observat că acest polimorfism s-a asociat semnificativ cu modificările angiografice la pacienții cu DZ tip 2 (62).

Într-un studiu realizat de către Ciccacci *et al.* în anul 2012, analizându-se rolul **polimorfismului genei TCF7L2** în patogenia retinopatiei diabetice și a neuropatiei diabetice,

s-a concluzionat că există o puternică corelație între **polimorfismul rs7903146** și prezența neuropatiei autonome precum și a retinopatiei diabetice (61).

De asemenea, autori precum Maeda S. *et al.* și Sale M.M. *et al.* au raportat existența unei asocieri între polimorfismul genei TCF7L2 și nefropatia diabetică în populația japoneză respectiv afro-americană (63,64).

Și studiul lui Hajarrah Hussain *et al.* publicat în anul 2014, realizat pe populația din India a demonstrat o asocieri între **polimorfismul rs7903146** al genei TCF7L2 și prezența nefropatiei diabetice (65).

În ceea ce privește rata filtrării glomerulare și prezența microalbuminuriei, studiul realizat de către Franceschini N *et al.* a raportat o asocieri între polimorfismul genei TCF7L2 și scăderea ratei filtrării glomerulare dar nu a raportat o asocieri și cu microalbuminuria (65,66).

În lucrarea prezentă, analizând complicațiile cronice ale DZ tip 2 nu am observat o asocieri semnificativă între genotipurile fiecărui polimorfism studiat și complicațiile micro- și macrovasculare ale DZ tip 2.

Există de asemenea și studii care nu au demonstrat o asocieri între polimorfismul genei TCF7L2 și mecanismele patogene ale neuropatie diabetice, nefropatiei diabetice și retinopatiei diabetice.

De exemplu, în studiul condus de către Buchbinder S. *et al.* publicat în anul 2008, nu s-a demonstrat o asocieri între polimorfismul genei TCF7L2 și complicațiile microvasculare asociate diabetului zaharat tip 2 (67).

Într-un studiu realizat de către Sousa A.G. *et al.* pe două populații independente din Brazilia s-a observat că există o asocieri între **polimorfismul rs7903146** al genei TCF7L2 și severitatea afectării coronariene în special la subiecții fără DZ (68).

De asemenea, studiul realizat de către Tais Assmann *et al.* pe o populație din sudul Braziliei nu a raportat o asocieri semnificativă între **polimorfismul rs7903146** și prevalența retinopatiei diabetice și a nefropatiei diabetice (69).

Analizând relația dintre factorii de risc precum fumatul, sedentarismul și consumul de alcool, nu am observat o asocieri semnificativă între aceștia și genotipurile celor două polimorfisme studiate, rezultate care sunt în concordanță și cu alte date din literatură precum cele raportate de către Wang *et al.* în studiul publicat în anul 2013 și care a fost realizat pe populația chineză din regiunea Han (49).

Rezultatele cercetării actuale demonstrează că **genotipul C/T al polimorfismului rs7903146 al genei TCF7L2** se asociază cu DZ tip 2 într-un grup populațional din România. De asemenea, **polimorfismul rs290487 al genei TCF7L2** nu se asociază cu DZ tip 2 în aceeași populație studiată. În vederea evaluării complete a posibilității asocierii **polimorfismului rs7903146** cu complicațiile DZ tip 2 sunt necesare studii viitoare care să includă un număr mai mare de subiecți.

ORIGINALITATEA LUCRĂRII

Acest studiu și-a propus lărgirea domeniului de cunoaștere privind implicarea factorilor genetici, în particular a **polimorfismelor genei TCF7L2** în patogenia DZ tip 2.

Rezultatele acestui studiu oferă în premieră informații privind distribuția celor două polimorfisme **rs7903146** și **rs290487** ale **genei TCF7L2** și rolul lor în riscul apariției DZ tip 2 pentru populația din Sud-Estul României.

În această cercetare secvențierea directă a ADN-ului genomic s-a realizat prin **metoda pirosecvențierii**, o metodă introdusă relativ recent în practica curentă de laborator.

CONCLUZII

1. În această lucrare am analizat pentru prima dată în România asocierea celor două polimorfisme ale **genei TCF7L2** și anume, **rs7903146** și **rs290487**, identificate prin metoda **pirosecvențierii**, cu statusul diabetic într-un subgrup populațional din București și împrejurimi.
2. Analiza statistică pentru **polimorfismul rs7903146** a evidențiat diferențe semnificative ale **frecvenței combinațiilor alelice între cele 2 loturi**, $\chi^2(2)=8,1$, $p=0,017$.
3. Am observat o asociere semnificativă între **diagnosticul de DZ tip 2** și prezența **genotipului (C/T+ T/T)** comparativ cu **genotipul C/C (modelul dominant)**, $OR=3,587$, $IC95\% = (1,354-9,506)$, $\chi^2(1)=6,91$, $p=0,009$.
4. Am observat o asociere semnificativă între **diagnosticul de DZ tip 2** și prezența **genotipului C/T** comparativ cu **genotipul (C/C+ T/T) (modelul co-dominant)**, $OR = 4,464$ $IC95\% = (1,484-13,429)$, $\chi^2(1)=7,72$, $p=0,005$.
5. De asemenea, am observat o asociere semnificativă între **diagnosticul de DZ tip 2** și prezența **genotipului C/T comparativ cu C/C (modelul heterozigot)**, $OR = 0,209$, $IC95\% = (0,068-0,643)$, $\chi^2(1)=8,11$, $p=0,004$.
6. Am observat o asociere semnificativă între diagnosticul de DZ tip 2 și frecvența **alelelor T** comparativ cu frecvența alelelor C, $OR = 0,455$ $IC95\% = (0,211-0,983)$, $\chi^2(1)=4,12$, $p=0,042$, și deoarece OR este subunitar, concluzionăm că **alela C are rol protectiv în riscul de DZ tip 2**.
7. În ceea ce privește **polimorfismul rs290487** nu am observat diferențe semnificative ale frecvenței combinațiilor alelice între cele două loturi, $p=0,982$; nu am observat o asociere semnificativă între diagnosticul de DZ tip 2 și prezența vreunui model genetic pentru **polimorfismul rs290487**, $p>0,05$, rezultatele fiind similare cu cele raportate și de către alți autori și de asemenea, nu am observat o asociere semnificativă între diagnosticul de DZ tip 2 și frecvența **alelelor C** comparativ cu frecvența alelelor T, $p=0,859$.
8. În ceea ce privește **predicția DZ tip 2**, rezultatele indică faptul că **polimorfismul rs7903146 este predictiv pentru diagnosticul de DZ tip 2**, $p=0,026$. Comparativ cu persoanele cu genotip C/C, cei cu **genotip C/T au de 5,13 ori mai multe șanse de a prezenta DZ tip 2, când celelalte variabile din model se păstrează constante**.

9. **Modelul dominant rs7903146 este predictiv pentru diagnosticul de DZ tip 2, $p=0,010$. Comparativ cu persoanele cu genotip C/C, cei cu genotip C/T + T/T au de 3,58 ori mai multe șanse de a prezenta DZ tip 2, când celelalte variabile din model se păstrează constante.**
10. Plecând de la genotipul polimorfismului **rs290487** nu am putut crea o predicție a diagnosticului de DZ tip 2, $p=0,836$ și nu am putut construi un model predictiv plecând de la **modelul aditiv** al **rs290487** ($p=0,849$) sau de la **modelul recesiv** al **rs290487** ($p=0,854$), precum nici pentru **modelul dominant** al **rs290487** ($p=0,907$).
11. Nu am observat o asociere semnificativă statistic între caracteristicile clinico-biologice ale subiecților din cele două loturi și genotipurile polimorfismelor studiate ($p>0,05$) cu excepția **valorii medii a IMC-ului** pentru **polimorfismul rs290487**.
12. De asemenea, nu am observat o asociere semnificativă între genotipurile polimorfismelor rs7903146 și rs290487 și complicațiile micro și macrovasculare ale DZ tip 2.
13. În plus, nu am observat o corelație semnificativă statistic între factorii de risc asociați DZ tip 2 și polimorfismele studiate.
14. Polimorfismul **rs7903146** al **genei TCF7L2** este cel mai important marker genetic asociat cu DZ tip 2.
15. Este importantă determinarea prezenței **polimorfismului genei TCF7L2** deoarece prezența acestuia s-ar putea asocia cu un anumit profil metabolic al pacienților, cu prezența anumitor complicații, ceea ce ar determina și o anumită atitudine terapeutică care în final ar ameliora prognosticul pacientului.
16. În concluzie, rezultatele studiului demonstrează faptul că **genotipul C/T** al polimorfismului **rs7903146** al **genei TCF7L2** precum și **modelele dominant, co-dominant și heterozigot** ale acestui polimorfism sunt asociate cu riscul de DZ tip 2, iar polimorfismul **rs290487** al **TCF7L2** nu este asociat cu riscul de DZ tip 2 într-un subgrup populațional al României.

BIBLIOGRAFIE

1. Târgoviște C., Botea V., Diabetul zaharat: definiție și clasificare în Tratat român de boli metabolice, vol. 1, sub redacția Viorel Șerban, ediția Brumar 2011, pg 69-72.
2. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 7th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015. <http://www.diabetesatlas.org>.
3. Moța M., Popa S.G., Moța E. *et al.* Prevalence of diabetes mellitus and prediabetes in the adult Romanian population: PREDATORR study. *J Diabetes*. 2016 May;8(3):336-44. doi: 10.1111/1753-0407.12297. Epub 2015 May 6.
4. Guja C., Etiopatogenia diabetului zaharat tip 2. în Tratat român de boli metabolice, sub redacția Viorel Șerban, editura Brumar, 2010, pg179-184.
5. Sun X., Yu W., Hu C., Genetics of Type 2 Diabetes: Insights into the Pathogenesis and Its Clinical Application. *Biomed Res Int*. 2014;2014:926713. doi: 10.1155/2014/926713. Epub 2014 Apr 17.
6. Steinhorsdottir V., Thorleifsson G., Reynisdottir I., *et al.*, A variant in *CDKAL1* influences insulin response and risk of type 2 diabetes, *Nat Genet*. 2007 Jun;39(6):770-5. Epub 2007 Apr 26.
7. Voight B.F., Scott L.J., Steinhorsdottir V. *et al.*, Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis, *Nat Genet*. 2010 Jul;42(7):579-89. doi: 10.1038/ng.609.
8. Silander K., Mohlke K.L., Scott L.J., *et al.*, Genetic variation near the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene predicts susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004 Apr;53(4):1141-9.
9. Harder M. N., Ribel-Madsen R., Justesen J.M., *et al.*, Type 2 diabetes risk alleles near *BCAR1* and in *ANK1* associate with decreased β -cell function whereas risk alleles near *ANKRD55* and *GRB14* associate with decreased insulin sensitivity in the Danish Inter99 cohort. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Apr;98(4):E801-6. doi: 10.1210/jc.2012-4169. Epub 2013 Mar 1.
10. Lyssenko V., Nagorny C.L., Erdos M.R., *et al.*, Common variant in *MTNR1B* associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet*. 2009 Jan;41(1):82-8. doi: 10.1038/ng.288. Epub 2008 Dec 7.
11. Boesgaard T.W., Grarup N., Jørgensen T., *et al.*, Variants at *DGKB/TMEM195*, *ADRA2A*, *GLIS3* and *C2CD B* loci are associated with reduced glucose-stimulated beta cell function in middle-aged Danish people, *Diabetologia*. 2010 Aug;53(8):1647-55. doi: 10.1007/s00125-010-1753-5. Epub 2010 Apr 26.
12. Nielsen T., Sparsø T., Grarup N., *et al.*, Type 2 diabetes risk allele near *CENTD2* is associated with decreased glucose-stimulated insulin release. *Diabetologia*. 2011 May;54(5):1052-6. doi: 10.1007/s00125-011-2054-3. Epub 2011 Jan 26.
13. Rees S.D., Hydrie M.Z., O'Hare J.P., *et al.*, Effects of 16 genetic variants on fasting glucose and type 2 diabetes in South Asians: *ADCY5* and *GLIS3* variants may predispose to type 2 diabetes, *PLoS One*. 2011;6(9):e24710. doi: 10.1371/journal.pone.0024710. Epub 2011 Sep 20.
14. Rung J., Cauchi S., Albrechtsen A., *et al.*, Genetic variant near *IRSI* is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1110-5. doi: 10.1038/ng.443. Epub 2009 Sep 6.
15. Boesgaard T.W., Gjesing A.P., Grarup N., *et al.*, Variant near *ADAMTS9* known to associate with type 2 diabetes is related to insulin resistance in offspring of type 2 diabetes patients-EUGENE2 study. *PLoS One*. 2009 Sep 30;4(9):e7236. doi: 10.1371/journal.pone.0007236.
16. Anand A., Chada K., In vivo modulation of Hmgic reduces obesity, *Nat Genet*. 2000 Apr;24(4):377-80.

17. Grant S.F., Thorleifsson G., Reynisdottir I., *et al.*, Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2006 Mar;38(3):320-3. Epub 2006 Jan 15.
18. Prokopenko I., Mc Carthy M. I., Lindgren C. M., Type 2 diabetes: new genes, new understanding. *Trends Genet.* 2008 Dec;24(12):613-21. doi: 10.1016/j.tig.2008.09.004. Epub 2008 Oct 25.
19. Duval A., Rolland S., Tubacher E., *et al.*, The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res.* 2000 Jul 15;60(14):3872-9.
20. Hansson O., Zhou Y., Renström E., Osmark P., Molecular Function of TCF7L2: Consequences of TCF7L2 Splicing for Molecular Function and Risk for Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2010 Dec;10(6):444-51. doi: 10.1007/s11892-010-0149-8.
21. Weise A., Bruser K., Elfert S., *et al.*, Alternative splicing of TCF7L2 transcripts generates protein variants with differential promoter-binding and transcriptional activation properties at Wnt/{beta}-catenin targets. *Nucleic Acids Res.* 2010 Apr;38(6):1964-81. doi: 10.1093/nar/gkp1197. Epub 2009 Dec 30.
22. Ip W., Chiang Y.T, Jin T., The involvement of the wnt signaling pathway and TCF7L2 in diabetes mellitus: The current understanding, dispute, and perspective. *Cell Biosci.* 2012 Aug 14;2(1):28. doi: 10.1186/2045-3701-2-28.
23. Cauchi S., Meyre D., Dina C., *et al.*, Transcription factor TCF7L2 genetic study in the French population: expression in human beta-cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2006 Oct;55(10):2903-8.
24. Peng S., Zhu Y., Lu B., *et al.*, TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes risk: a comprehensive and updated meta-analysis involving 121,174 subjects. *Mutagenesis.* 2013 Jan;28(1):25-37. doi: 10.1093/mutage/ges048. Epub 2012 Nov 26.
25. Chang Y.C., Chang T.J., Jiang Y.D., *et al.*, Association study of the genetic polymorphisms of the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and type 2 diabetes in the Chinese population. *Diabetes.* 2007 Oct;56(10):2631-7. Epub 2007 Jun 19.
26. Ng M.C., Park K.S., Oh B., *et al.*, Implication of genetic variants near TCF7L2, SLC30A8, HHEX, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, and FTO in type 2 diabetes and obesity in 6,719 Asians. *Diabetes.* 2008 Aug;57(8):2226-33. doi: 10.2337/db07-1583. Epub 2008 May 9.
27. Pi-Hua Liu, Yi-Cheng Chang, Yi-Der Jiang, *et al.*, Genetic Variants of TCF7L2 Are Associated with Insulin Resistance and Related Metabolic Phenotypes in Taiwanese Adolescents and Caucasian Young Adults. *J Clin Endocrinol Metab*, September 2009, 94(9):3575–3582. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2009-0609>.
28. Miyake K., Horikawa Y., Hara K., *et al.*, Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects. *J Hum Genet.* 2008;53(2):174-80. Epub 2007 Dec 21.
29. Ren Q., Han X. Y., Wang F., *et al.*, Exon sequencing and association analysis of polymorphisms in TCF7L2 with type 2 diabetes in a Chinese population. *Diabetologia.* 2008 Jul;51(7):1146-52. doi: 10.1007/s00125-008-1039-3. Epub 2008 May 21.
30. Wen J., Ronn T., Olsson A., *et al.*, Investigation of type 2 diabetes risk alleles support CDKN2A/B, CDKAL1, and TCF7L2 as susceptibility genes in a Han Chinese Cohort. *PLoS One.* 2010 Feb 10;5(2):e9153. doi: 10.1371/journal.pone.0009153.
31. Yu M., Xu X. J., Yin J. Y., *et al.*, KCNJ11 Lys23Glu and TCF7L2 rs290487(C/T) polymorphisms affect therapeutic efficacy of repaglinide in Chinese patients with type 2 diabetes. *Clin Pharmacol Ther.* 2010 Mar;87(3):330-5. doi: 10.1038/clpt.2009.242. Epub 2010 Jan 6.

32. Qiao H., Zhang X. L., Zhao X., *et al.*, Genetic variants of TCF7L2 are associated with type 2 diabetes in a northeastern Chinese population. *Gene*. 2012 Mar 10;495(2):115-9. doi: 10.1016/j.gene.2011.12.055. Epub 2012 Jan 8.
33. Luo Y.Y., Wang H.Y., Han X.Y., *et al.*, Meta-analysis of the association between SNPs in TCF7L2 and type 2 diabetes in East Asian population. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009 Aug;85(2):139-46. doi: 10.1016/j.diabres.2009.04.024. Epub 2009 May 30.
34. Takeuchi F., Serizawa M., Yamamoto K., *et al.*, Confirmation of multiple risk loci and genetic impacts by a genome-wide association study of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes*. 2009 Jul;58(7):1690-9. doi: 10.2337/db08-1494. Epub 2009 Apr 28.
35. Gupta V., Khadgawat R., Ng H. K. T., *et al.*, A validation study of type 2 diabetes-related variants of the TCF7L2, HHEX, KCNJ11, and ADIPOQ genes in one endogamous ethnic group of North India. *Ann Hum Genet*. 2010 Jul;74(4):361-8. doi: 10.1111/j.1469-1809.2010.00580.x.
36. Groves C.J., Zeggini E., Minton J., *et al.*, Association analysis of 6,736 U.K. subjects provides replication and confirms TCF7L2 as a type 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk. *Diabetes*. 2006 Sep;55(9):2640-4.
37. Chandak G.R., Janipalli C.S., Bhaskar S., *et al.*, Common variants in the TCF7L2 gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population. *Diabetologia*. 2007 Jan;50(1):63-7. Epub 2006 Nov 9.
38. Ng M.C., Tam C.H., Lam V.K., *et al.*, Replication and identification of novel variants at TCF7L2 associated with type 2 diabetes in Hong Kong Chinese. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Sep;92(9):3733-7. Epub 2007 Jul 3.
39. Zheng X., Ren W., Zhang S., *et al.*, Association of type 2 diabetes susceptibility genes (TCF7L2, SLC30A8, PCSK1 and PCSK2) and proinsulin conversion in a Chinese population. *Mol Biol Rep*. 2012 Jan;39(1):17-23. doi: 10.1007/s11033-011-0705-6. Epub 2011 Mar 25.
40. Shiina H., Igawa M., Breault J., *et al.*, The human T-cell factor-4 gene splicing isoforms, Wnt signal pathway, and apoptosis in renal cell carcinoma, *Clin Cancer Res*. 2003 Jun;9(6):2121-32.
41. Jin T., George Fantus I., Sun J., Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cell Signal*. 2008 Oct;20(10):1697-704. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.04.014. Epub 2008 May 8.
42. Gaulton K.J., Nammo T., Pasquali L., *et al.*, A map of open chromatin in human pancreatic islets. *Nat Genet*. 2010 Mar;42(3):255-9. doi: 10.1038/ng.530. Epub 2010 Jan 31.
43. Pearson E.R. Translating TCF7L2: from gene to function. *Diabetologia*. 2009 Jul;52(7):1227-30. doi: 10.1007/s00125-009-1356-1. Epub 2009 Apr 22.
44. Villareal D.T., Robertson H., Bell G.I., *et al.*, TCF7L2 variant rs7903146 affects the risk of type 2 diabetes by modulating incretin action. *Diabetes*. 2010 Feb;59(2):479-85. doi: 10.2337/db09-1169. Epub 2009 Nov 23.
45. Smith U. TCF7L2 and type 2 diabetes--we WNT to know. *Diabetologia*. 2007 Jan;50(1):5-7. Epub 2006 Nov 11.
46. Jin T., Liu L., The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. *Mol Endocrinol*. 2008 Nov;22(11):2383-92. doi: 10.1210/me.2008-0135. Epub 2008 Jul 3.
47. Zhang C., Bao W., Rong Y., *et al.*, Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2013 Jul-Aug;19(4):376-90. doi: 10.1093/humupd/dmt013. Epub 2013 May 19.

48. Szepietowska B., Moczulski D., Wawrusiewicz-Kurylonek N., *et al.*, Transcription factor 7-like 2-gene polymorphism is related to fasting C peptide in latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Acta Diabetol.* 2010 Mar;47(1):83-6. doi: 10.1007/s00592-009-0133-4. Epub 2009 Jun 17.
49. Wang J., Li L., Zhang J., *et al.*, Association of rs7903146 (IVS3C/T) and rs290487 (IVS3C/T) polymorphisms in TCF7L2 with type 2 diabetes in 9,619 Han Chinese population. *PLoS One.* 2013;8(3):e59053. doi: 10.1371/journal.pone.0059053. Epub 2013 Mar 25.
50. Declaration of Helsinki (The Code of Ethics of the World Medical Association, last updated at the 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013)
51. American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes-2015 Diabetes Care Volume 38, Supplement 1, January 2015.
52. Levey A.S., Stevens L.A., Schmid C.H., A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009 May 5;150(9):604-12.
53. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements*, vol.3, issue, January 2013.
54. Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlén M., Nyrén P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem.* 1996 Nov 1;242(1):84-9. PubMed PMID: 8923969.
55. Nyrén P. The history of pyrosequencing. *Methods Mol Biol.* 2007;373:1-14. PMID: 17185753
56. Lyssenko V., Lupi R., Marchetti P., *et al.*, Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2007 Aug;117(8):2155-63.
57. Song Y., Yeung E., Liu A., *et al.*, Pancreatic beta-cell function and type 2 diabetes risk: quantify the causal effect using a Mendelian randomization approach based on meta-analyses. *Hum Mol Genet.* 2012 Nov 15;21(22):5010-8. doi: 10.1093/hmg/dds339. Epub 2012 Aug 29.
58. Barra G.B., Dutra L.A., Watanabe S.C., *et al.*, Association of the rs7903146 single nucleotide polymorphism at the Transcription Factor 7-like 2 (TCF7L2) locus with type 2 diabetes in Brazilian subjects. *Arq Bras Endocrinol Metabol;* 2012 Nov;56(8):479-84
59. Shokouhi S., Delpisheh A., Haghani K., *et al.*, Association of rs7903146, rs12255372, and rs290487 polymorphisms in TCF7L2 gene with type 2 diabetes in an Iranian Kurdish ethnic group. *Clin Lab.* 2014;60(8):1269-76
60. Buraczynska M., Swatowski A., Markowska-Gosik D., *et al.* Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphism and complication/comorbidity profile in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Sep;93(3):390-5. doi: 10.1016/j.diabres.2011.05.017. Epub 2011 Jun 8.
61. Ciccacci C., Di Fusco D., Cacciotti L., *et al.* TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes: association with diabetic retinopathy and cardiovascular autonomic neuropathy. *Acta Diabetol.* 2013 Oct;50(5):789-99. doi: 10.1007/s00592-012-0418-x. Epub 2012 Jul 28.
62. Muendlein A., Saely C.H., Geller-Rhomberg S., *et al.*, Single nucleotide polymorphisms of TCF7L2 are linked to diabetic coronary atherosclerosis. *PLoS One.* 2011 Mar 15;6(3):e17978. doi: 10.1371/journal.pone.0017977.
63. Sale M.M., Smith S.G., Mychaleckyj J.C., *et al.*, Variants of the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene are associated with type 2 diabetes in an African-American

- population enriched for nephropathy. *Diabetes*. 2007 Oct;56(10):2638-42. Epub 2007 Jun 29.
64. Maeda S., Osawa N., Hayashi T., *et al.*, Genetic variations associated with diabetic nephropathy and type II diabetes in a Japanese population. *Kidney Int Suppl*. 2007 Aug;(106):S43-8.
 65. Hajarrah Hussain, Vinu Ramachandran, Samathmika Ravi, *et al.*, TCF7L2 rs7903146 polymorphism and diabetic nephropathy association is not independent of type 2 diabetes - a study in a south Indian population and meta-analysis. *Endokrynol Pol* 2014; 65 (4): 298–305, DOI: 10.5603/EP.2014.0041.
 66. Franceschini N., Shara N.M., Wang H., *et al.* The association of genetic variants of type 2 diabetes with kidney function. *Kidney Int*. 2012 Jul;82(2):220-5. doi: 10.1038/ki.2012.107. Epub 2012 Apr 18.
 67. Buchbinder S., Rudofsky G., Jr., Humpert P.M., *et al.*, The DG10S478 variant in the TCF7L2 gene is not associated with microvascular complications in type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008 Apr;116(4):211-4. Epub 2007 Dec 10.
 68. Sousa A.G., Marquezzine G.F., Lemos P.A., *et al.*, TCF7L2 polymorphism rs7903146 is associated with coronary artery disease severity and mortality. *PLoS One*. 2009 Nov 17;4(11):e7697. doi: 10.1371/journal.pone.0007697.
 69. Assmann T.S., Duarte G.C., Rheinheimer J., *et al.*, TCF7L2 rs7903146 (C/T) polymorphism is associated with risk to type 2 diabetes mellitus in Southern-Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014 Dec;58(9):918-25. doi: 10.1590/0004-2730000003510.