T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEPTİN RESEPTÖR GENİ VE NÖROPEPTİD Y GENİ POLİMORFİZMLERİNİN OSAHS İLE İLİŞKİSİ

İlknur ÇINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Sennur DEMİREL

KONYA-2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEPTİN RESEPTÖR GENİ VE NÖROPEPTİD Y GENİ POLİMORFİZMLERİNİN OSAHS İLE İLİŞKİSİ

İlknur ÇINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Sennur DEMİREL

Bu proje Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü tarafından 112022006 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA–2013

ÖNSÖZ

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkılarıyla desteğini, sabrını ve zamanını esirgemeyen sevgili hocam, tez danışmanım ve aynı zamanda Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. S. Sennur DEMİREL'e, bölüm hocalarım Yrd. Doç. Dr. H. Gül DURSUN ve Yrd. Doç. Dr. A. Bülent TURHAN'a, Göğüs Hastalıkları öğretim üyesi ve Uyku Laboratuarı sorumlusu Yrd. Doç. Dr. Şebnem YOSUNKAYA'ya, Araştırma sırasında bizi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, Hayatımın her aşamasında tüm zorluklara katlanarak emek harcayan, sevgi ve hoşgörülerini hiçbir zaman esirgemeyen anneme, babama, kardeşlerime, her süreci birlikte yaşadığımız değerli dostum Sümeyra ÇETİNKAYA'ya ve Serkan KÜÇÇÜKTÜRK'e , Döndü AKIN ve Anıl Didem AYDIN'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ..... ii

SİMGELER VE KISALTMALAR v

ŞEKİLLER vi

ÇİZELGELER vii

1.GİRİŞ 1

1.1. Uykuda Solunum Bozuklukları 1

1.1.1. Epidemiyoloji.....1

1.1.2. Etiyoloji 3

1.1.3. Klinik Özellikler 3

1.1.4 Polisomnografi (PSG) 4

1.1.5 Patofizyoloji.....4

1.2. Obezite, Leptin ve Leptin Reseptörü 5

1.2.1. Obezite 5

1.2.2. Leptin 6

1.2.3. Leptin Reseptörü (LEPR) 7

1.2.4. Nöropeptid Y 9

NPY'nin katıldığı ana sinyal yolakları.....11

Nöropeptid Y reseptörleri.....12

Nöropeptid Y (NPY) geni 12

NPY gen yapısı ve peptid sentezi.....12

1.3.Amaç 14

2. GEREÇ ve YÖNTEM.....15

2.1. Hasta Kabulü 15

2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....15

2.3. Uyku Çalışması 16

2.4. Hastadan Kan Alınması.....16

2.5. Genomik DNA İzolasyonu.....17

2.5.1. İzolasyonda Kullanılan Çözeltiler.....18

2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 19

2.6.1. Agaroz Jelde Görüntüleme 20
2.7. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) 21
2.8. ARMS-PZR (Amplification Refractory Mutation System) 22
2.8.1. Agaroz Jelde Görüntüleme 24
2.9. İstatistiksel değerlendirme 25
2.10. Etik Kurul Onayı 25
3. BULGULAR 26
3.1. Hasta Ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması 26
3.2. LEPR Genindeki Pro1019Pro Polimorfizminde Hasta ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması 27
3.3. NPY Genindeki T1128C Polimorfizminde Hasta Ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması 31
4. TARTIŞMA 36
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 40
6. ÖZET 41
7. SUMMARY. 42
8. KAYNAKLAR 43
9. EKLER 49
EK-A ETİK KURUL ONAYI 49
EK-B BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU 50
10. ÖZGEÇMİŞ 51

SİMGELER VE KISALTMALAR

AHI: Apne/Hipoapne İndeksi

BMI: Body Mass Index

HDL: High-Density Lipoprotein

JAK: Janus-aktive kinaz

LDL: Low-Density Lipoprotein

LEPR: Leptin Reseptörü

NPY: Nöropeptid Y

OB-Ra: Kısa reseptör

OB-Rb: Uzun reseptör

OSAHS: Obstructive Sleep Apnes/Hypoapnes Syndrome

PSG: Polisomnografi

PZR: Polimeaz Zincir Reaksiyonu

ARMS-PZR: Amplification Refractory Mutation System

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SNP: Single nucleotid polymorphisms

CPON: C-terminal peptid

ARC: Arkuat nükleus

PVN: Paraventriküler nükleus

DMN: Dorsamedial nükleus

VMN: Ventromedial nükleus

SNP: Single nucleotide polymorphism

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Leptin ile aktifleşen JAK/STAT yolağı

Şekil. 1.2. LEPR geni OB-Rb formunun şematik görünümü

Şekil 1.3. Besin alımı ve enerji dengesinin arkuat çekirdeklerdeki iki nöron tipiyle düzenlenmesi.

Şekil 1.4. NPY geni ve protein işlenmesi

Şekil 1.5. 1128T>C nükleotid değişiminin NPY genindeki yerleşimi

Şekil 2.1. NPY geni 1128T>C polimorfizmine ait PZR ürünü örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü

Şekil 2.2. RFLP yöntemi ile elde edilen NPY genine ait 1128T>C genotipleri

Şekil 2.3. ARMS-PZR yöntemi ile elde edilen LEPR genine ait Pro1019Pro genotipleri.

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu içeriği

Çizelge 2.2. PZR koşulları

Çizelge 2.3. BsiEI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim protokolü

Çizelge 2.4. NPY geni 1128T>C nükleotid değişimine özgül BsiEI restriksiyon endonükleaz enzim kesim koşulları

Çizelge 2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu içeriği

Çizelge 2.6. ARMS-PZR koşulları

Çizelge 3.1. Hasta ve Kontrol gruplarında LEPR geni Pro1019Pro ve NPY geni 1128T>C polimorfizmine ait Yaş, BMI ve PSG karakteristiklerine ait değerler.

Çizelge 3.2. Pro1019Pro polimorfizminde hasta ve kontrol grupları arasında birey sayıları ve genotip dağılım sıklıkları

Çizelge 3.3. Pro1019Pro polimorfizminde hasta gruplarında AHI ve BMI'ya göre ayrılmış alt grupların genetik modellerle karşılaştırılması

Çizelge 3.4. Pro1019Pro polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin kodominant modelde karşılaştırılması

Çizelge 3.5. Pro1019Pro polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin dominant ve resesif modelde karşılaştırılması

Çizelge 3.6. 1128T>C polimorfizminde hasta ve kontrol grupları arasında birey sayıları ve genotip dağılım sıklıkları

Çizelge 3.7. 1128T>C polimorfizminde hasta gruplarında AHI ve BMI'ya göre ayrılmış alt grupların genetik modellerle karşılaştırılması

Çizelge 3.8. 1128T>C polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin kodominant modelde karşılaştırılması

Çizelge 3.9. 1128T>C polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin dominant modelde karşılaştırılması

Çizelge 3.10. Farklı ülkelerde NPY geni 1128T>C nükleotid değişiminin genotip dağılımı ve C allel sıklıkları ile bağımsız iki oran karşılaştırma testi P değerleri

1.GİRİŞ

1.1. Uykuda Solunum Bozuklukları

Uykuda solunum bozukluğu önemli bir halk sağlığı problemidir. Uykudaki solunum bozuklukları, uyku sırasında solunum paternindeki değişikliklere bağlı olarak gelişen ve bu hastalarda morbidite ve mortalitenin artmasına yol açan klinik tablolardır. Uykuda solunum bozukluğunun en önemli grubunu "uyku apne sendromu" oluşturmaktadır (Köktürk 1998). Apne; Oronazal airflowmetre ile saptanan, 10 sn veya daha fazla süreli hava akımında kesilme olmasıdır. Hipopne; Hava akımının oronazal airflowmetre ile saptanan 10 sn veya daha uzun süre ile (% 50 veya daha fazla) azalması, beraberinde oksijen saturasyonunun % 4 veya daha fazla oranda düşmesi ve arousalların görülmesidir (Köktürk 1999). Uyku apnesi, American Sleep of Medicine 2007 rehberine göre on saniye veya daha fazla süreyle ağız ve burunda hava akımının durması olarak tanımlanmaktadır.

Uyku apnesi, hava akımının durumu ve solunum çabasının varlığına göre üç alt grupta incelenebilir.

Obstrüktif apne; Solunum çabasının sürmesine rağmen hava akımının olmamasıdır. Santral Apne Uyku sırasında solunum çabası ve hava akımının olmamasıdır. Miks Apne; Başlangıçta santral tipte olan apnenin solunum çabası başlamasına karşın devam etmesidir ve tüm olguların % 90-95'ini oluşturması nedeniyle uyku apne sendromu denildiğinde pratik olarak "obstrüktif uyku apne sendromu" (Obstructive Sleep Apnea Syndrome =OSAS / OSAHS) anlaşılmaktadır (Köktürk 1998).

1.1.1. Epidemiyoloji

OSAHS, tüm ırk, yaş, sosyoekonomik düzey ve erkeklerde daha sık olmakla birlikte her iki cinsiyette de görülebilen, en sık karşılaşılan uyku bozukluklarından biridir. Prevalansı çeşitli toplumlarda %1-5 arasında değişmektedir (Köktürk 1998).

Obstrüktif uyku apne/hipoapne sendorumu çeşitli yaş gruplarını etkileyebilir. OSAHS sıklığı özellikle 40-65 yaşlarında pik yapmaktadır (Barış 1993). Ancak 65 yaşından sonra OSAHS görülme sıklığı bazı yayınlara göre azalmaktadır (McNamara ve ark 1993, Stradling 1995). Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, yaşlanmanın vücut yağ dağılımı, doku elastisitesi, ventilasyon kontrolü, pulmoner ve kardiyovasküler fonksiyonlar üzerindeki etkisinin rol oynadığı, ayrıca yaşlılıkta artan

komorbiditelerin de ÜSY (Üst Solunum Yolu) obstrüksiyonlarına eğilimi arttırdığı sanılmaktadır (Lavie 1983, McNamara ve ark 1993).

1980'li yıllarda yapılan çalışmalarda OSAHS görülme sıklığının kadın/erkek oranları 1/7-1/10 gibi değerlerde bulunmuştur. Oysaki 90'lı yıllarda yapılan çalışmalarda kadınlarda da oldukça yüksek sıklıkta görüldüğü saptanmış ve her yaş grubu için kadın/erkek oranı 1/3 olarak belirtilmiştir (Wiegand ve Zwillich 1994). OSAHS' la ilgili risk faktörleri yaşla önemli ölçüde değişmektedir (Köktürk 1998). Orta yaş populasyonların da OSAHS; erkeklerde 3-4 kat daha sık görülürken, ileri yaştaki bu fark daha az, çocukluk çağında ise önemsizdir. OSAHS'lı kadınların çoğunun morbid obez ve genellikle postmenopozal dönemde olmaları nedeniyle, premenopozal dönemde salgılanan progesteron ve östrojenin OSAHS'a karşı koruyucu rol oynadığı yönünde spekülasyonlar yapılmıştır. Örneğin bir çalışmada premenopozal kadınlarda postmenopozal kadınlara göre genioglossus kas aktivitesinin daha yüksek olduğu ve postmenopozal kadınlarda östrojen + progesteron tedavisinden sonra kas aktivitesinin arttığı görülmüştür (Popovic ve White 1998). Ancak OSAHS'lı erkek olgulara progesteron tedavisi uygulandığında apne sayısında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Bresnitz ve ark 1994).

Santral tipte gözlenen obezite ÜSY çevresinde yağ birikimi ile ÜSY açıklığını etkilerken, abdominal yağ birikimi ile de solunum paternini etkileyerek OSAHS'a eğilimi arttırmaktadır. Obezitenin OSAHS için majör risk faktörü olduğuna dair çok sayıda destekleyici çalışma mevcuttur. Örneğin, Wisconsin çalışmasının verileri, epidemiyolojik olarak obez hastalarda OSAHS'ın arttığını göstermektedir (Coleman 1999). OSAHS'lı olguların % 75'inin obez olduğu gösterilmiştir. Hafif ya da orta derecede kilo verme bile uyku apnesinde düzelme sağlamaktadır (Smith ve ark 1985).

Güney Pasifik adalarında yaşayan bazı ırklarda kalıtsal obezite nedeniyle OSAHS'ın daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Bu kişilerde artmış OSAHS sıklığının sık rastlanan brakisefaliye bağlı olabileceği savunulmaktadır. Bu ırklara ait bazı ailelerde OSAHS insidansının genel toplumdakinden daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Guilleminault ve ark 1995). Ayrıca ÜSY'de yapısal değişikliklerle seyreden ve solunum merkezini etkileyen birçok konjenital ve genetik geçişli hastalıkta uyku bozukluklarının sık görüldüğü belirtilmektedir (Köktürk 1998).

1.1.2. Etiyoloji

Obstrüktif uyku apne sendromu (OSAHS), özellikle orta yaşlı obez erkek bireylerde yaygın görülen bir hastalıktır. OSAHS kardiyopulmoner ve metabolik fonksiyonda görülen anormalite ve gündüz aşırı uyuklamanın eşlik ettiği, uykuda tüm ya da parçalı üst solunum yolu obstrüksiyonu olarak tanımlanmıştır. Solunum yolunun anatomik daralması, üst solunum yolu dokusunun artan daralması, anormal üst solunum yolu refleksleri ve solunum yolu tıkanıklığına katkıda bulunan farengeal kas disfonksiyonu olan OSAHS, çoğunlukla metabolik sendromla ilişkilidir. Metabolik sendrom; hipertansiyon, obezite, dislipidemia ve diyabet gibi artan insülin direnci ve kardiyovasküler risktir. Obezite, uyku apnesi için güçlü bir risk faktörüdür (Zhang ve ark 1994, Le Stunnf ve ark 2000, Oguz K ve ark 2005). Birlikte ele alınan obezite ve OSAHS için birçok aday genin olması şaşırtıcı değildir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda apne/hipopne indeksindeki genetik dağılımın yaklaşık yarısının obezite fenotipiyle birlikte görüldüğü ortaya konmuştur (Zhang ve ark 2005). Kilo artışıyla birlikte genetik polimorfizmler apne için risk oluşturabilir. Kilo ve nefes kontrolü, üst solunum yolu kas fonksiyonu ve uyku karakteristiğini düzenleyen yolakların birbirleriyle ilişkileri belirlenmiştir. Burada OSAHS ve obeziteyi birbirlerinden bağımsız etkileyen pleotropik etkili genler yer alır. Diğer yandan obeziteyle ilişkili özelliklerde bu lokusun etkisini ayarlamak için obeziteye duyarlı genlerle etkileşim halinde olabilen OSAHS; uyku düzensizliği, intermittent hipoksi gibi çevresel faktörleri ortaya çıkarabilir (Popko ve ark 2007).

1.1.3. Klinik Özellikler

Uyku sırasındaki solunum bozukluklarının saptanması, gerek hastalığın prognozu, gerekse uygun tedavinin verilmesi bakımından önemlidir. OSAHS tanısında kullanılan tanı yöntemleri arasında klinik tanının önemi büyüktür. OSAHS'ın major semptomları horlama, tanıklı apne ve gündüz aşırı uyku halidir.

Gürültülü horlama OSAHS'ın tipik bir özelliğidir ve birçok durumda bir solunum olayının sonucu kısa bir uyanıklık (arousal) ile sonlanmaktadır. Bu olaylar hastada, uyku ile uyanıklık arasında dalgalanmalar yaptığı için uyku bölünmeleri ve döngüsel bir solunum paterni ile sonuçlanır (Danny ve ark 2008).

Kardiyopulmoner semptomlar, nöropsikiyatrik ve diğer semptomlara ise ağız kuruluğu, gece telemesi, nokturnal öksürük eşlik edebilir (Köktürk 1998, Köktürk ve ark 2000).

1.1.4 Polisomnografi (PSG)

Uykuda solunum bozuklukları ve diğer uyku bozukluklarını tespit etmede kullanılan altın standart yöntemdir. PSG, uyku sırasında nörofizyolojik, kardiyorespiratuvar ve diğer fizyolojik parametrelerin, genellikle gece boyunca, eş zamanlı ve devamlı kaydedilmesi olarak tanımlanır (Köktürk 1999).

PSG; uykuyla ilişkili solunum bozuklukları tanısında, CPAP (Continuous positive air pressure) titrasyonunda, tanı konulmuş OSAHS hastalarında cerrahi öncesinde, bazı hastalarda tedaviyi değerlendirmede, narkolepsi düşünülen çoklu uyku latensi testi yüksekliğinde, uykuyla ilgili davranışların hastaya ya da başkalarına zarar verdiği durumda, atipik parasomnilerde rutin olarak uygulanmaktadır (Kryger ve ark 2005). Polisomnografik incelemeye karar verilen hasta yeterli teknik donanımlı, tercihan ses yalıtımı iyi ve video monitorizasyonunun bulunduğu tek kişilik odalarda bir gece süreyle yatırılır.

Bir saatlik uyku dönemindeki apne ve hipopnelerin toplamına ise apne-hipopne indeksi (AHI) denir. AHI, obstrüktif uyku apnesini belirlemekte kullanılır. Bir saatlik uyku dönemindeki apne sayısına apne indeksi (AI) denir. (Köktürk 1999). Bir gecelik PSG sonunda tespit edilen apne-hipopne indeksine göre OSAHS derecelendirilmesi yapılır. AHI > 5 olan olgular OSAHS olarak kabul edilmekle birlikte klinik önemi olan olgularda AHI > 20'dir. Çünkü bu olgularda mortalitenin AHI < 20 olan gruba oranla anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (Köktürk 1998).

1.1.5. Patofizyoloji

Obstrüktif uyku apne sendromunun patofizyolojisindeki etkenler bireyler arasında çeşitlilik göstermektedir. En önemli etkenler; üst hava yolu anatomisi, uykuda üst hava yollarındaki dilatatör kasların solunumsal değişikliklere cevabı, uyku esnasında artmış solunum dürtüsüne karşı uyanma eğilimi, solunum kontrol sisteminin stabilitesi ve akciğer hacimlerindeki değişiklikleri kapsar (White 2005).

1.2. Obezite, Leptin ve Leptin Reseptörü

1.2.1 Obezite

OSAHS obez bireylerde yaygın görülen bir hastalıktır (Popko ve ark 2007). BMI (Body Mass İndex), 25,0-29,9 arası olanlar aşırı kilolu 30,0 ve daha yukarı olanlar obez olarak tanımlanmıştır (Marik 2000). Orta yaşlılarda obezitenin OSAHS riskini yaklaşık 10-14 kat arttırdığı görülür. Bu nedenle kilo kaybı OSAHS'ın şiddetini azaltabilir. Obezite, azalan göğüs duvarı uyumuyla ortaya çıkan hipoventilasyondan kaynaklanan nazofarengal kapasitenin azalmasıyla üst solunum yolu dokularında yağ birikimi nedeniyle OSAHS'a duyarlılığı arttırabilir (Reddline ve Tishler 2000).

Aşırı vücut ağırlığının üst solunum yolundaki yapısal ve fonksiyonel değişiklikleri içeren birçok durum nedeniyle, soluk alışverişini etkilediği ve obeziteyle ilişkili olarak artmış olan oksijen ihtiyacına bağlı olarak OSAHS' ın şiddetlendiği hipotezi üzerinde durulmaktadır (Strobel ve ark 1996, Barvaux ve ark 2000).

Çalışmalardan elde edilen bulgular; uyku apnesi, uyuklama, inflamasyon ve insülin direnci, damar tıkanıklığı, kardiyovasküler hastalıklar arasındaki çift yönlü tehlikeli ilişki hipotezine destek sağlar. Obezite ve OSAHS birbirini etkileyen ve fenotipte etkisini gösteren birçok risk faktörünün eşlik ettiği kompleks hastalıklardır (Popko ve ark 2007).

Kilo, nefes kontrolü ya da kraniofasial morfolojiyi etkileyen genler pleotropik etkilerinden dolayı OSAHS ve obezite arasındaki ilişkiden kısmen sorumlu olabilir. Aile ve ikiz çalışmalarının sonuçları; populasyonlar içinde genetik faktörlere dayanan obezitenin ölçülen dağılımının %40-70 arasında olduğunu ortaya koymuştur. Obezitenin gelişimine önemli oranda katkıda bulunduğu düşünülen otonomik, endokrinolojik ve hipotalamik fonksiyonlardaki anomalilerle ilişkili olan genetik faktörler metabolik hız, termogenez, yağ depolama ve yeme davranışını etkiler (Redline ve Tishler 2000). Obezite enerji alımı ve harcanması arasındaki dengesizlik nedeniyle sık görülen medikal bir durumdur (Carek ve ark 1999). Obezite; hiperlipidemi, hiperglisemi ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıkların morbidite ve mortalitesi için ciddi bir risk faktörüdür (Richard ve ark 1999).

Yapılan çalışmalar obezitenin genetik, çevresel ve nöroendokrin faktörlerin sonucu olduğunu göstermiştir (Friedman ve ark 1998). Kilo düzenlenmesi ve kilo artışı bir dizi davranışsal, sosyal ve hormonal faktörleri içeren kompleks bir süreçtir

(Hirschberg 1998). Obezitede kilo artış süreci daha komplekstir. Leptin ve nöropeptid Y' nin keşfi obezitenin patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına neden olmuştur (McNeely ve ark 1999, Ruige ve ark 1999, Yokosuka ve ark 1999).

Obezitenin etiyolojisi uzun periyodlar süresince pozitif enerji dengesine yol açma potansiyeline sahip birçok faktörle birlikte oldukça karmaşık bir yapı gösterir. Bu faktörler içerisinde yüksek yağlı diyet, düşük seviyede fiziksel aktivite, belli vücut kütlesi ve kompozisyonuna göre düşük bazal metabolizma, perhiz durumundaki yüksek soluk alışveriş oranı ve muhtemelen yüksek insülin duyarlılığı yer alır. Birçok obez bireyde dolaşımdaki yüksek leptin seviyeleri bir leptin direnci göstergesi olabilir. Antiobezite hormonu olan leptinin keşfi obezitenin patofizyolojisine olan ilgiyi bu noktada yoğunlaştırmıştır. (Marik 2000).

1.2.2. Leptin

1994 yılında Zhang ve arkadasları tarafından kesfedilen leptin, adını Yunanca leptos (ince) kelimesinden almıştır (Zhang 1994). Yapısal olarak sitokinlere benzeyen, 16 kilodalton moleküler agırlıkta tek zincirli ve 167 aminoasit içeren bir protein hormondur (Zhang 1994, Meier 2004). Leptin geni 3 ekzon ve 2 introndan oluşur. Leptin en fazla farklılaşmış adipositler tarafından üretildiği gibi mide fundusu, iskelet kası, karaciger ve plasentadan da üretilir. Adipositlerden sentezlenen leptin, dolaşıma katılır, proteinlere bağlanır ve özellikle hipotalamusta merkezi sinir ağında etkilidir. Hipotalamusta reseptörlere bağlanmasıyla tokluk faktörü gibi hareket ettiği kabul edilen leptin, besin alımını inhibe ederek enerji harcamasını uyarır (Ahima ve ark 1999, Houseknecht ve ark 1999).

Kanda serbest ve proteine bağlı olmak üzere iki formda bulunur. Leptinin aktivitesinden serbest formun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Obez bireylerde serumdaki leptinin büyük kısmının serbest formda olduğu belirlenmiştir (Brabant ve ark 2000). Vücut yağ kütlesi hakkında adipöz dokudan beyne bilgi veren kan yoluyla taşınan bir sinyal olduğu düşünülen leptin; adipöz doku ve beyin arasında iletişimi sağlar (Donahue ve ark 1999).

Leptin enerji alımı veya harcanmasını, nöroendokrin fonksiyonu düzenleyen birkaç nörepeptidin ifadesini değiştirmek için hipotalamustaki spesifik reseptörlerine bağlanarak düzenler (Marik 2000). Leptinin ana etki mekanizması birçok hipofizer hormonun regülasyonunda görev alan ve asıl etkisi istahı artırmak olan nöropeptid Y

(NPY)' nin arkuat nükleustan salınımı ve ifadesini inhibe etmek şeklindedir (Bjorbaek ve ark 2004).

NPY'nin azaltılması, enerji harcanması ve sempatik sinir sistemi çıkış akımının artmasıyla sonuçlanır. Leptin doğrudan lipid oksidasyonunu arttırarak; yağ asidi ve trigliserit sentezini azaltarak hücre içi lipid artışını engeller. Lipid metabolizmasına etkisi ise yağ asidi sentezinde enzim hızını sınırlayarak, asetil CoA karboksilaz aktivitesini engelleyici yöndedir(Marik 2000).

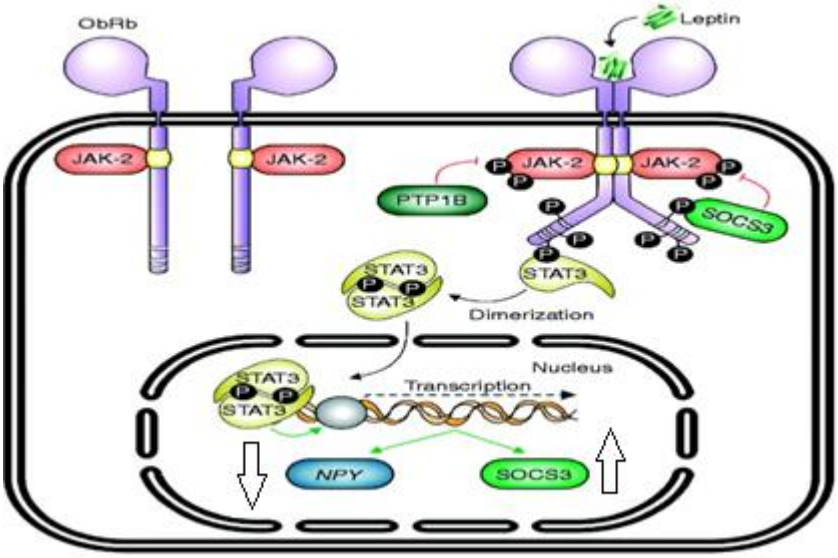
1.2.3. Leptin Reseptörü (LEPR)

Tartaglia ve ark (1995) leptin reseptörlerinin yapısını ve yerleşimini tanımlamışlardır. LEPR ilk defa fare koroid pleksusundan klonlanmıştır (Tartaglia 1997). Tek zincirli bir polipeptid olan leptinin N terminal bölgesi biyolojik aktiviteden ve reseptöre bağlanmadan sorumludur. Leptin reseptörü, tip 1 sitokin reseptör ailesinin bir üyesidir.

Tartaglia ve ark (1995)' nın leptin reseptörünü keşfetmeleri leptinin etkisinin anlaşılmasında ilk basamağı teşkil etmiştir. Leptin reseptörlerinin, koroid pleksus ve hipotalamusta yerleşik olması leptinin etkisinin hipotalamus seviyesinde düzenlendiğini düşündürür.

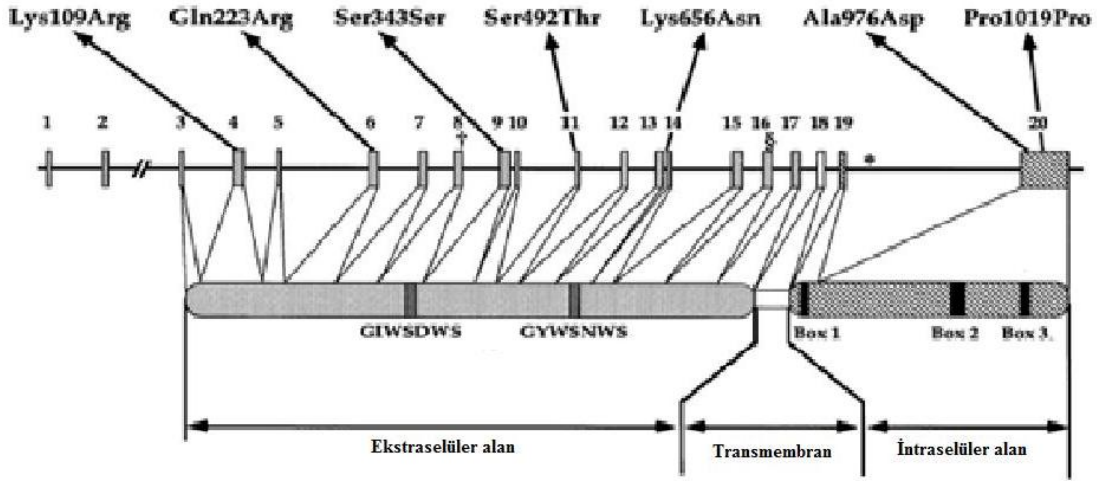
LEPR, şekil1.1'de görüldüğü gibi bir protein trozin kinaz olan JAK-sinyal dönüştürücüsü ve transkripsiyon aktivatörü olan transmembran proteininin uyarıcısıdır (Yong-Jun ve ark 2004). Leptin reseptörleri (Ob-R) ilk olarak fare koroid pleksuslarından "expression cloning" ile izole edilmiş ve sitokin ailesi reseptörlerinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır. Ob-R dizisi olasılıkla 2 ligand bağlayan domain içerir. Burada leptin reseptörlerinin iki büyük izoformu mevcuttur; ilki taşıyıcı fonksiyonu olduğuna inanılan kısa leptin reseptörüdür (Ob-Ra) ve hipotalamusta kan-beyin bariyerinin aşılmasından sorumlu olduğu görülen bu reseptör obez diabetik db/db farelerde defektedir. Leptinin bu fonksiyonları yerine getirebilmesi için beynin merkezine ulaşması gerekir ve bunu koroid pleksustaki bir leptin reseptörü aracılığıyla yapar. Koroid pleksus, leptine serebrospinal sıvı aracılığıyla hipatalamusa girme imkânı verir. Leptin reseptörünün bu formu, Ob-Ra izoformu olup birçok dokuda ifade edilmektedir. Kısa sitoplazmik domaine sahip olan Ob- Ra izoformu kültüre edilmiş hücrelerde gen ifadesini ve sinyal iletimini, zayıf da olsa aktive eder. İkinci izoform; leptin sinyalinin ilk basamağında fonksiyon gösterdiği düşünülen uzun leptin reseptörüdür (ob-Rb). Leptin reseptörleri başlıca beyin, kalp,

testis ve adipöz gibi farelerin çeşitli dokularında farklı seviyelerde ifade edilir. Ob-Rb, sinyal transdüksiyonu için gerekli çeşitli kısımları içeren bir sitoplazmik bölgeye sahiptir. Diğer formlar bu kısımların bir kısmını veya hiçbirini bulundurmaz (Ahima ve ark 1996).



Şekil 1.1. Leptin ile aktifleşen JAK/STAT yolağı (Marroquí ve ark 2012).

Ob-R geninin leptin reseptörünün çeşitli alternatif ek formlarını kodladığını gösterildi. Bunlardan Ob-Re transmembran leptin reseptörünün çözülebilir bir formudur (Gülle ve ark 2000). Çözülebilir leptin reseptörünün (Ob-Re), leptini bağlama yeteneğinde olduğu gösterilmiştir (Friedman ve ark 1998).



Şekil 1.2. LEPR geni OB-Rb formunun şematik görünümü (Matsuoka ve ark 1997).

Şekil 1.2' de görüldüğü gibi OB-Rb gen yapısında 7 dizi varyantı bulunur. Bizim çalışmamızda inceleyeceğimiz ekzon 20'de yer alan 3057. pozisyonda yer alan T→C (Pro1019Pro) tek nükleotid polimorfizmidir (SNP).

1.2.4. Nöropeptid Y

Farklı anatomik bölgeler yağ depolarının düzenlenmesinde santral bir rol oynar. Hipotalamusun aslında enerji paylaşımı ve besin alımını düzenlediği bilinmektedir. Memeli hipotalamusu; Leptin, NPY ve insülin gibi farklı birkaç sinyal molekülü yoluyla beslenme davranışını kuvvetli bir şekilde etkilemektedir (Richard ve ark 1999).

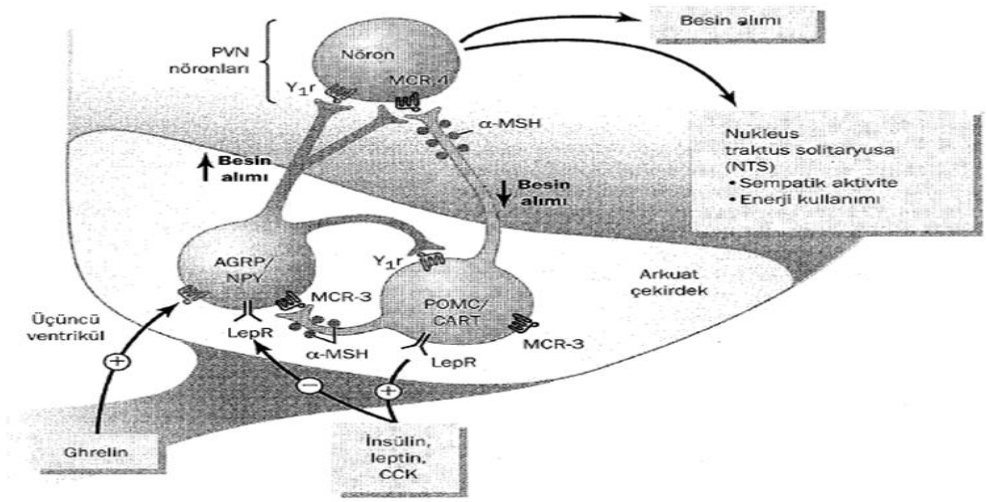
Beyin dokusunda yoğun olarak bulunan NPY molekülü, Tatemoto ve Mutt isimli araştırmacılar tarafından 1982 yılında domuz beyninde saptanmıştır. NPY pankreatik polipeptid ailesinin bir üyesidir ve merkezi sinir sisteminde üretilen bir nörotransmitterdir (Hökfelt 1991). Merkezi sinir sisteminde NPY'nin bulunduğu bölgeler, hipokampus, amygdala, hipotalamusun 3.ventriküle komşu kısmında yerleşen arkuat nükleustur (ARC). Kısmi olarak ise paraventriküler nükleus (PVN), suprakiazmatik nükleus, median eminens ve dorsomedial nükleusta (DMN) bulunur (Gehlert 1999, Small ve ark 2004, Goodman 2008). Yapılan bir çalışmada hipotalamusta paraventriküler nukleus (PVN) ve ventromedial nukleus (VMN) hasarı memeli ve kuşlarda şiddetli obeziteye neden olmuştur (Rray ve ark 1998).

NPY, duygusal davranışların düzenlenmesi (Heilig ve ark 1993), besin alınımının kontrol edilmesi (Clark ve ark 1984), nöronal gelişim (Hansel ve ark

2001), ağrı modülasyonu (Shi ve ark 2001), üreme (Kasuya ve ark 1998), nöbet etkinliği (Woldbye ve ark 1997), kardiovasküler homeostaz (Pedrazzini ve ark 1998), termogenez (Harrington ve ark 2000), uyku-uyanıklık siklusunun düzenlenmesi, günlük sirkadiyen ritim (Yannielli ve ark 2001), kan basıncının düzenlenmesi (Hu ve ark 1997) gibi birçok fizyolojik fonksiyonla ilişkilidir.

Bunların yanında NPY; yeme bozuklukları, obezite, anksiyete, Huntington hastalığı, Alzheimer, Parkinson, epilepsi gibi çeşitli hastalıkların patogenezine karışır (Chen ve ark 2005). Enerji harcanmasını azaltan hipotalamik nörotransmitter olan NPY, beslenme ve iştahın etkili bir uyaranıdır (Baskin ve ark 1999). Hipotalalamik NPY'nin ifadesi ve salınımı leptin ile inhibe edilir (Ahima ve ark 1999). Leptin ve NPY konsantrasyonları arasındaki etkileşimin vücut ağırlığının düzenlenmesinde önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (Segal ve ark 1996).

Leptinin; başlıca beslenme davranışı, otonomik ve nöroendokrin fonksiyonu etkileyen hipotalamik nöropeptidlerin ifadesini düzenleyerek enerji homeostazını etkilediği düşünülür. Nöropeptid Y; leptin seviyesine karşı biyolojik yanıtın önemli bir parçasıdır. Örneğin oreksijenik peptid olan NPY; beslenme yetersizliği, ileri açlık ve leptin noksanlığının bir sonucu olarak hipotalamusta arttırılır, ve bu artan NPY ifadesi leptin yönetimiyle dengelenir (Şekil 1.3). Bu etkileşim enerji dengesi ve vücut yağ kitlesinin düzenlenmesinde önemli olabilir (Ahima ve ark 1996, Schwartz ve ark 1996, Flier ve ark 1998).



Şekil 1.3. Besin alımı ve enerji dengesinin arkuat çekirdeklerdeki iki nöron tipiyle düzenlenmesi (Guyton ve Hall 2007).

NPY önemli bir endojenöz iştah dönüştürücüsüdür. Yeme davranışının günlük yönetimine katılan NPY üreten nöronlar beyin sapında hipoatalamusun arkuat nükleusunda yerelleşmiştir (Yokosuka ve ark 1999). NPY seviyesi ob/ob (obez) farelerde leptin yoksunluğu /eksikliğinin bir sonucu olarak hipotalamusta arttırılır (Deniz ve saygı 2002).

Normal hayvanların hipotalamusu içinde NPY'nin süreki artışı, azalmış termogenez ve obeziteyi kapsayan leptin yoksunluğu fenotipine benzer. NPY yoksunluğu kısmen ob/ob (obez) farelerde obezitenin ve leptin yoksunluğunun zararlı tüm endokrin etkilerinin düzelmesine neden olur; bu yüzden NPY antagonistleri ve leptin olası anti obezite ajanları olarak ilgi çekicidir (Hirschberg 1998).

NPY'nin katıldığı ana sinyal yolakları

NPY molekülü G protein eşlikli reseptörler aracılığı ile bazı sinyal iletim yolaklarında rol almaktadır. Bu sinyal yolaklarının birinde, adenil siklaz inbibisyonu ile ATP'den cAMP (Siklik adenozin monnofosfat) oluşmasını engellemektedir. Bir diğerinde, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu değişimine göre inositol fosfata bağımlı ya da inositol fosfattan bağımsız olarak fosfolipaz C ile lipit metabolizması üzerinde etki göstermektedir. Son olarakta, plazma membranı düzeyinde kalsiyum ve potasyum kanallarını bloke ederek ya da aktive ederek kalsiyum ve potasyum sinyal yolaklarında etki göstermektedir (Silva ve ark 2002).

Nöropeptid Y reseptörleri

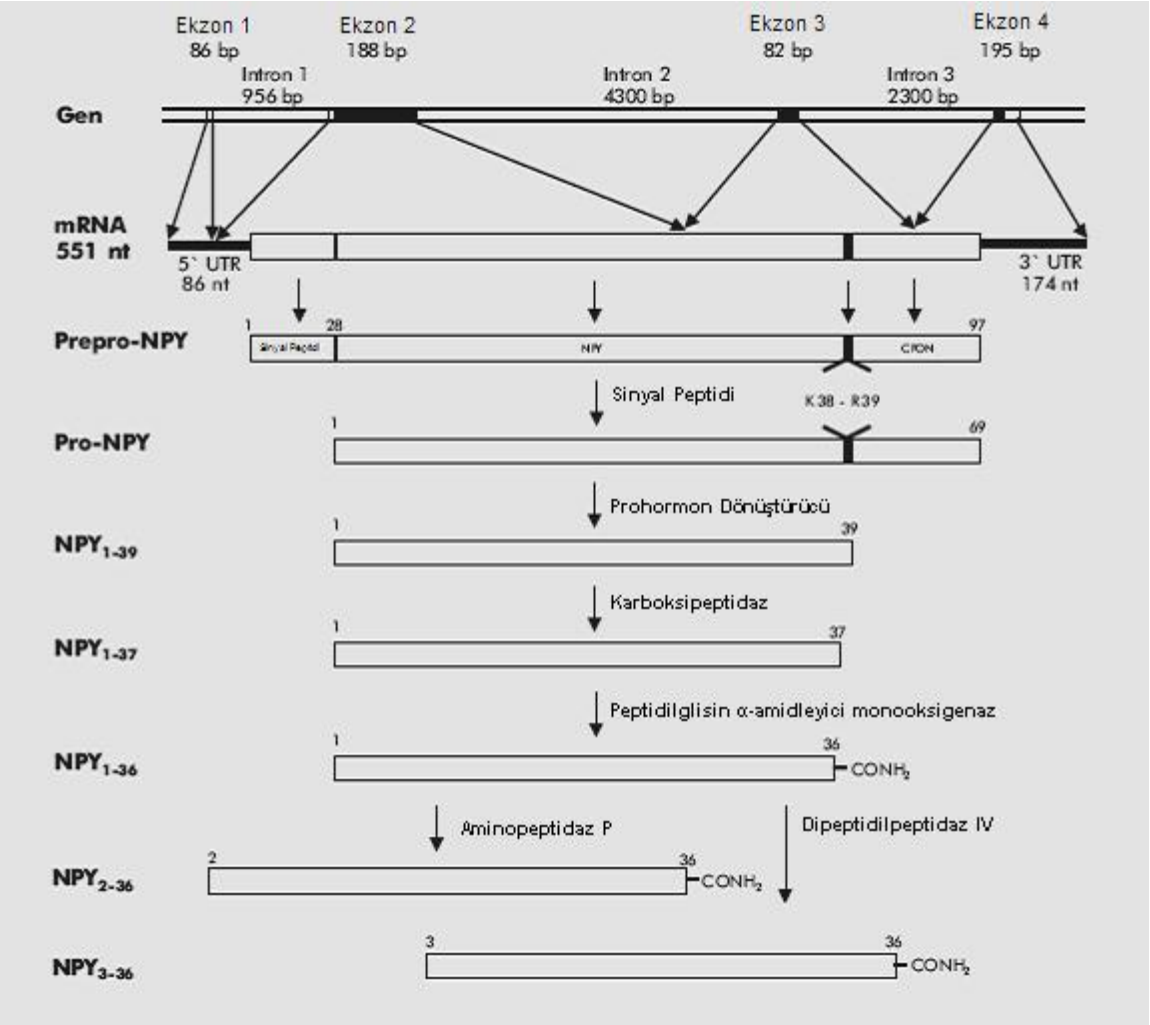
Yapılan çalışmalarda NPY etkisinin 6 ayrı reseptör (Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6) üzerinden yürütüldüğü saptanmıştır (Wettstein ve ark 1995). Bu reseptörlerin tümü siklik adenozin monofosfat (cAMP) üretimini inhibe eden G protein eşlikli reseptörlerdir. Y1 reseptörü beyinde hipokampus, hipotalamus ve amigdala bölgelerinde post-sinaptik olarak bulunmaktadır ve etanole karşı nörobiyolojik cevapta görevli olduğu bilinmektedir (Thiele ve ark 2003). Hipokampus ve amigdala strese cevapta ve bilginin işlenmesinde rol oynayan beyin bölgeleridir (Morales-Medina ve ark 2009). Y2 reseptörü birincil olarak pre-sinaptik bölgede yerleşik olup NPY'nin fazla salınımını inhibe etmektedir. Y5 reseptörü post-sinaptik yerleşimli olup hipokampusta besin alımının kontrolünde görevlidir. (Thiele ve ark 2003). Y4 reseptörü ilk bulunduğunda pankreatik polipeptid reseptörü olarak tanımlanmış, fakat daha sonraları NPY reseptörü olduğu anlaşılmıştır. Y5 reseptörü yeme davranışı ile ilgili olan reseptördür. Y6 reseptörü ise klonlanmış, fakat insanlarda fonksiyonel olmadığı bildirilmiştir (Silva ve ark 2002).

Nöropeptid Y (NPY) geni

NPY gen yapısı ve peptid sentezi

İnsanda NPY geni 7. kromozomun p kolunda 15.1 bölgesinde yerleşik olup, 4 ekzondan ve 3 introndan oluşur ve 36 aminoasitlik bir peptid sentezler. Birinci ekzon 5' uçta proteine çevrilmeyen bölgeyi (5'UTR), ikinci ekzon sinyal peptidini kodlar. Üçüncü ekzondan amid donör bölgesi ve prohormon çevirici enzim için kesim bölgesi ile karboksi ucun bir kısmı kodlanır. Son ekzondan ise NPY'nin karboksi ucu (CPON) ve 3'uçta proteine çevrilmeyen bölge (3'UTR) kodlanır (Şekil 1.2). Biyolojik olarak aktif olan NPY, 96 aminoasitlik öncül NPY (prepro-NPY) molekülünden oluşur. Bu öncül molekül translasyon tamamlandıktan sonra endoplazmik retikuluma gider, burada sinyal peptidi kesilir, geriye kalan 69 amino asitlik öncül NPY (pro-NPY) 38. pozisyondaki lizin ile 39. pozisyondaki glisin amino asitlerinden tanınarak prohormon konvertazlar tarafından kesilir ve 39 amino asitlik NPY oluşur. Bu 39 aminoasit uzunluğundaki NPY'nin 30 amino asitini CPON (C-terminal peptid) kısmı oluşturmaktadır. CPON kısmı iki enzim (karboksi peptidaz ve peptidilglisin α-amidleyici monooksigenaz) tarafından işlenir ve biyolojik olarak aktif amidlenmiş NPY salınır. Amid grubu NPY'nin biyolojik aktivitesi için esastır ve aynı zamanda

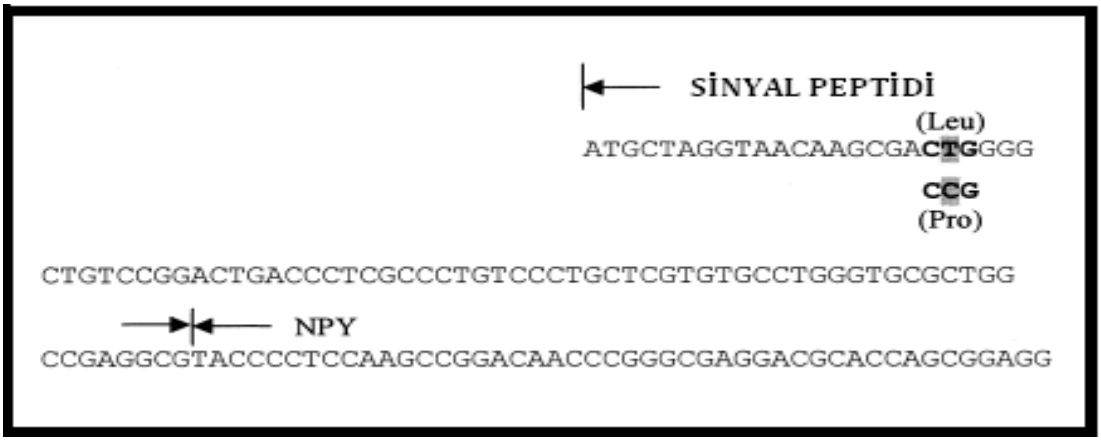
peptidi karboksipeptidazlar tarafından yıkılmaktan korur. Olgunlaşmış NPY daha sonra iki enzim tarafından ileri işlenmeye tabi tutulur. Bu enzimler dipeptidil peptidaz-IV ve aminopeptidaz P'dir. Bu enzimlerin işlemlerinden sonra sırasıyla NPY3-36 ve NPY2-36 oluşur (Şekil 1.4)(Tuşgül 2011).



Şekil 1.4. NPY geni ve protein işlenmesi (Tuşgül 2011).

Araştırmamızda analiz edilecek olan NPY geni 1128T>C nükleotid değişimi genin 2. ekzonunda yer alan 1128. poziyonda bulunan timinin sitozine dönüşmesi şeklindedir. Gendeki bu değişim peptidin 7. amino asidi olan lösinin proline (Leu7Pro) dönüşümüne yol açmaktadır (Şekil 1.5). Nöropeptid Y molekülünün sinyal dizisi içinde yer alan bu aminoasit dönüşümü, peptidin sentezini değiştirmemekte, ancak sentez sonrası paketlenmesini ve salınımını etkilemektedir. Ökaryotik sinyal dizileri tipik olarak N-ucunda hidrofilik bir bölge, ortada hidrofobik bölge ve C ucunda da polar bölge içerirler. Buradaki 7. aminoasit hidrofilik-

hidrofobik bölge sınırında bulunmaktadır. Bu nükleotid değişimi ile artmış serum kolesterol seviyesi, obezite, ateroskleroz ve diyabet arasında ilişki kurulmuştur (Mitchell ve ark 2008).



Şekil 1.5. 1128T>C nükleotid değişiminin NPY genindeki yerleşimi (Makino ve ark 2001).

1.3.AMAÇ

OSAHS'lı hastalarda leptin reseptörü Pro1019Pro ve nöropeptid Y genindeki 1128T>C (Leu7Pro) polimorfizmleri ile ilgili bugüne kadar yapılmış doğrudan bir çalışma bulunmamakla birlikte, OSAHS ve obezitenin patofizyolojisi birbirleriyle benzerlik göstermektedir. Çalışmada Leptin reseptör genindeki 3057T>C Pro1019Pro ve Nöropeptid Y genindeki 1128T>C (Leu7Pro) polimorfizmlerinin Konya bölgesindeki sıklığının belirlenmesi ve bu polimorfizmlerin OSAHS hastalığı için genetik bir yatkınlık oluşturup oluşturmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda hasta ve kontrol olgularında saptanan genotipler OSAHS ve obezite ile ilişkili klinik ve biyokimyasal parametreler ile birlikte değerlendirilmiştir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hasta Kabulü

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Uyku Laboratuvarına başvuran erkek bireylerden horlama, tanıklı apne ve gündüz aşırı uyku hali şikâyetlerinin en az biri ya da üçü birlikte olanlar çalışmaya dahil edildi. Bu bireyler muayene edilerek, boyun ile bel çevresi ve kan basınçları ölçüldü. Hastaların rutin biyokimyasal parametreler (hemogram, glikoz, kolesterol, trigliserit, HDL, LDL) ve diğer tahlilleri (EKG, solunum fonksiyon testi, iki yönlü akciğer grafisi) yaptırmaları için yönlendirildi. Yatışı yapılan hastalar akşam PSG testi için hazırlandı. Yaklaşık 1-1,5 saat arasında süren hazırlıklar sonrası, hastanın sabaha kadar uyku durumu sürekli olarak gözlenerek ortalama 6-8 saat süren standart PSG prosedürüne uygun kayıtları alındı. Alınan kayıtlar sabah uzman doktor tarafından değerlendirilerek tanı konuldu ve hastalığın ağırlık derecesi (AHI' ye göre) belirlendi. Hastane personeli ve yakın çevreden gönüllü olarak çalışmaya katılmayı kabul eden bireyler kontrol grubuna dahil edildi, hastalara uygulanan kabul prosedürü ve PSG uygulandı. PSG testi sonrası AHI <5 'in altında olan normal bireyler çalışmaya alındı.

2.2. Çalışma gruplarının oluşturulması

Hasta grupları OSAHS dışında başka bir uyku problemi ve solunum bozukluğu bulunmayan obez ve obez olmayan hastalardan oluşturuldu. Kontrol grubuna ise zayıf ve tamamen sağlıklı -herhangi bir uyku problemi ve ek hastalığı olmayan- bireyler dahil edildi. BMI değeri obez ve aşırı kilolu olanlarda >27, obez olmayanlarda ≤27 olarak kabul edildi. Hasta grubu BMI indeksine göre Obez/Hasta (1) ve Obez olmayan/Hasta (2) olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı. 1. Grup için 84, 2. Grup için 69 ve kontrol grubu için 38 birey çalışıldı.

OSAHS'lı hastalar AHI'ye göre istatistiksel değerlendirme için 3 alt gruba ayrıldı. Buna göre hafif olanlar 5- 14, orta dereceli 15-29, ağır dereceli ≥30 olarak belirlendi.

2.3. Uyku Çalışması

Kesin tanısı konulacak hastaya uyku süresince durumunu gözleyebilmek için bir gece uyku laboratuarında altın polisomnografi testi uygulandı (VIASYS Healthcare GmbH, Hoecberg, Germany). Bu test oronazal hava akımı kayıdı (termistor veya oro-nazal kanül), toraks ve abdomen hareketini kaydetmek için kemer (gerilmeyi ölçmek), 2 kanal EKG (elektrokardiyogram), Çene-EMG (submental elektromyogram) ve bacak-EMG (bacak elektromyogram), sağ ve sol EOG (elektrookülogram), 6 kanal EEG (elektroensefalogram C4-A_1, C_3-A_2, O_2-A_1), oksijen saturasyon probu (pulse oksimetre), horlama sensörü'ne (mikrofon) ait parametreler kayıt edildi. Hastalara, gündüz aşırı uyku halinin ölçülmesi için subjektif bir test olarak kabul gören Epworth uykululuk skalası uygulandı ve 10 puan ve üzeri "patolojik" olarak değerlendirildi. Apne ≥10sn hava akımındaki kesilme, hipoapne ≥10 sn süresince bazal hava akımındaki 50 % azalma ile birlikte 3% 'lük desaturasyon veya bir arousal ile sonlanması olarak tanımlandı.

2.4. Hastadan kan alınması

Belirlenen kriterlere uyan hasta ve sağlıklı bireylerden genomik DNA (Deoksiribonükleik asit) izolasyonunda kullanılmak üzere antikoagülan (EDTA-Etilendiamintetraasetikasit) içeren vakumlu tüplere 10 ml periferal kan alındı ve -20 ^{0}C' de depolandı.

2.5. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için klasik SDS ve Proteinaz K yöntemi kullanıldı.

10 ml'lik kanlar 50 ml' lik falkon tüplere konuldu. Üzerlerine 0,5 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) eklendi. Bunların üzerine 2X Lysis Buffer ilavesi ile 50 ml' ye tamamlandı. 10 dakika boyunca tüpler alt üst edilerek iyice karıştırıldı. Daha sonra 30 dakika buzun içinde bekletildi. Buzdan alındıktan sonra 3000 rpm de $+4^0$C de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerin süpernatant fazı atıldı. Tüplerdeki pellet üzerine 3 ml Salt/EDTA eklenerek iyice vortekslendi. Daha sonra üzerlerine 0,3 ml %10'luk SDS (Sodyum dodesil sülfat) solüsyonu, 150 µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek örnekler 55 ^{0}C de 3 saat etüvde bekletildi. Bekleme süresi sonunda tüplerin üzerine 3 ml Fenol (pH 8,0) eklendi. Tüpler 20 saniye oldukça sert bir şekilde çalkalandı ve sonra 5 dakika da yumuşak şekilde ters yüz edildi. Daha sonra tüpler 3000 rpm de $+4^0$C de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerdeki süpernatant kısmı yeni steril falkon tüplere alındı. Her tüpün üzerine 3 ml Fenol: Kloroform: İzoamil Alkol (25:24:1) eklendi. Tüpler 20 saniye oldukça sert bir şekilde çalkalandı ve sonra 5 dakika da yumuşak şekilde ters yüz edildi. Daha sonra tüpler 3000 rpm de $+4^0$C de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerdeki süpernatant kısmı yeni steril falkon tüplere alındı. Süpernatanın 1/10' u kadar 3M Na Asetat (NaAc) pH=5,2 eklendi. Üzerlerine, alınan süpernatant kısmının 2,5 katı kadar -20^0C de soğutulmuş %95'lik etanol (EtOH) eklendi. Tüpler sert bir şekilde sallanarak çöken DNA'lar cam çubuk ile alındı ve yeni steril 1,5 ml' lik ependorf tüplere konuldu. Pelletler kurutuldu ve alkol uzaklaştırıldı. Daha sonra pellet, 0,5 ml 10 mM Tris (pH 8,0) ile sulandırıldı.

2.5.1. İzolasyonda kullanılan çözeltiler

10x Lysis Buffer

770 mM NH_4Cl

46 mM $KHCO_3$

10 mM EDTA

Salt Edta

75 mM NaCl

25 mM EDTA

%10 SDS solüsyonu;

SDS	10 gr
dH_2O	100ml

10 mM Tris : (Tris MA: 121,4)

Sodyum Asetat Çözeltisi: (NaAc MA: 136)

2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

NPY genindeki 1128T>C polimorfizmi (rs16139) için primerler http://frodo.wi.mit.edu/ adresindeki online primer tasarlama programı ile tasarlandı. Bu polimorfizmin analizi için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı.

İleri primer: 5'-TCGCAGCGCCGAGTAGTATCTGGCCATG-3' Tm: 66 ^{0}C

Geri primer: 5'-CTCCTGGGTTCTCTCTGCGGGACTGGGA-3' Tm: 67 ^{0}C

PZR, her bir örnek için çizelge 2.1' de miktarları ve konsantrasyonları verilen 25 ul reaksiyon hacminde ve reaksiyon koşullarında çalışıldı. PZR sonrası 310 bç (baz çifti)' lik PZR ürünü elde edildi. PZR çalışması için peQLab-primus 96 advanced marka cihaz kullanıldı. PCR koşulları çizelge 2.2' de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu içeriği.

Stok	25µl İçin Kullanılan	Son Konsantrasyon
10X tampon	2.5 µl	1X
2.5mM dNTP	1.6µl	10mM
İleri primer (100ng/µl)	0.28 µl	50 pmol/ul
Geri primer (100ng/µl)	0.28 µl	50 pmol/ul
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0.8 µl	2,5 U/ul
Genomik DNA	2 µl	50-150 ng/ml
dH2O	15.04µl	
MgCl2	2.5 µl	
TOPLAM	**25 µl**	

Çizelge 2.2. PZR koşulları.

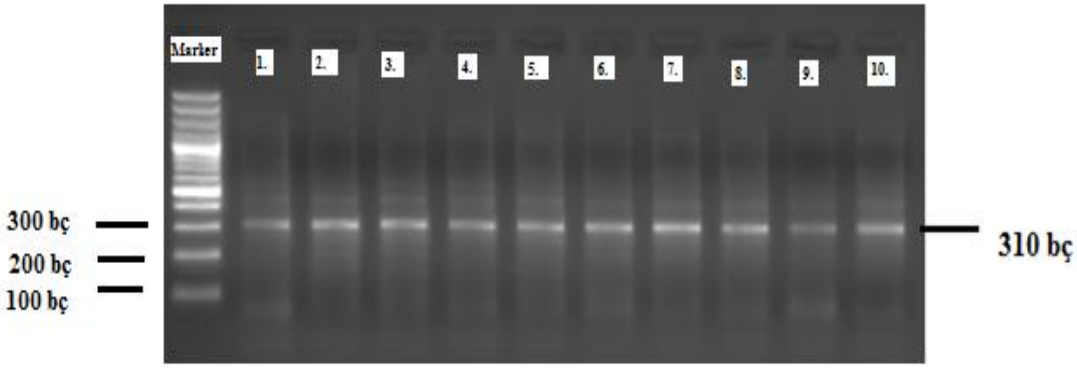
Başlangıç Denatürasyonu	**94 ^{o}C**	**8 dakika**
Denatürasyon	94 ^{o}C	45 saniye
Birleşme	64 ^{o}C	45 saniye
Uzama	72 ^{o}C	45 saniye
Son Uzama	**72 ^{o}C**	**10 dakika**

2.6.1. Agaroz Jelde Görüntüleme

PZR sonuçlarını değerlendirmek için % 2' lik Agaroz Jel hazırlandı. Her bir örnek için 5 ul PZR ürünü ve 2,5 ul yükleme boyası karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 45 W akımla 20 dakika yatay elektroforezde yürütüldü. Daha sonra jel ultraviyole transsimülatörde foroğraflandı (Şekil 2.1).

50X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA): 1 litre hazırlamak için 242 gr Tris, 100 ml 0,5M EDTA, 57,1 ml Glasiyel asetik asit ve yeteri kadar dH_2O eklendi. Hacim 1000 ml ye tamamlanmaya yakın HCl ile pH 7,6-7,8' e ayarlandı.

% 2' lik Agaroz jel hazırlama: 100 ml hacim için 2 gr agaroz tartıldı ve 100 ml' ye tamamlandı. 1 dakika boyunca yüksek ayarda mikrodalga fırında eritildi. Sonra çeker ocak içinde PZR ürünlerini görünür hale getirmek için 10 ul EtBr (Etidyum Bromür) eklenerek hafifce karıştırıldı. Daha sonra elektroforez kalıbına döküldü. Jel donduktan sonra PZR ürünleri kuyucuklara yükleme tamponu ile yüklendi. Şekil 2.1' de agaroz jelde yürütülen PZR ürünü örnekleri görülmektedir.



Şekil 2.1. NPY geni 1128T>C polimorfizmine ait PZR ürünü örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

2.7. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

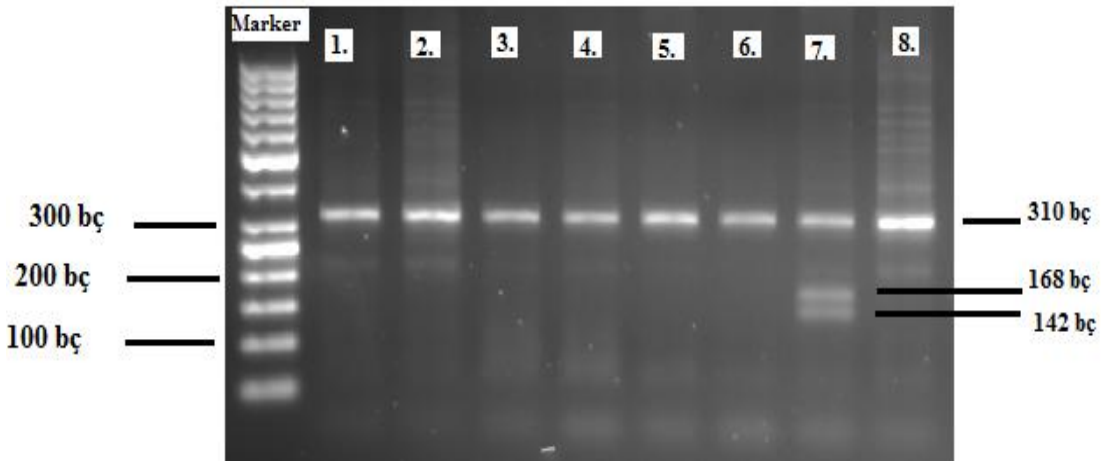
Çalışmamızda kullanılan NPY geni 1128T>C polimorfizmine özgül restriksiyon endonükleaz enzimi kesim protokolü çizelge 2.3' te, bu enzimin tanıma bölgesi ise çizelge 2.4'te verilmiştir. Enzim kesim reaksiyonu sonuçları, % 2'lik agaroz jelde 45W akımla 35 dakika elektroforezde yürütülerek görüntüler değerlendirildi. Bu analizde 1128. pozisyonda bulunan yabanıl allel olan T alleli varlığında *BsiEI* restriksiyon endonükleaz enzimi için bir tanıma bölgesi yokken, mutant allel olarak anılan C alleli varlığında tanıma bölgesi oluşmaktadır. PZR ürünlerinin enzim ile muamelesi sonucunda C alleli varlığında, 310 baz çiftlik PZR ürünü 168 bç ve 142 bç uzunluğunda iki parçaya ayrılmaktadır, T alleli varlığında ise enzim kesim bölgesi olmadığından 310 bç.'lik kesim ürünü elde edilmektedir. Heterozigotluk durumunda ise 310, 168 ve 142 bç'lik DNA bantları gözlenmektedir. Analizlerimiz sonucunda çalışma grubunu oluşturan bireylerde homozigot TT ve heterozigot TC genotipi saptandı, homozigot CC genotipine ise rastlanmadı. 1128T>C nükleotid değişiminin BsiEI restriksiyon endonükleaz enzimi ile analizine ait jel fotoğrafı Şekil 2.2' de görülmektedir.

Çizelge 2.3. BsiEI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim protokolü.

İçerik	**Miktar**
Hedef DNA	10 µl
Restriksiyon enzimi	1 µl
10X kesim tamponu	2.5 µl
Steril distile su 0.5 µl	11.5 µl
TOPLAM	**25 µl**

Çizelge 2.4. NPY geni 1128T>C nükleotid değişimine özgül BsiEI restriksiyon endonükleaz enzim kesim koşulları.

Nükleotid Değişimi	Enzim	Tanıma Bölgesi	İnkübasyon Sıcaklığı İnkübasyon Süresi
1128T>C	BsiEI	5’ CGRY↓CG..3’ 3’..GC↑YRGC..5’	37 °C 12 saat



Şekil 2.2. RFLP yöntemi ile elde edilen NPY genine ait 1128T>C genotipleri.

2.8. ARMS-PZR (Amplification Refractory Mutation System)

Bu çalışmada LEPR geni Pro1019pro (rs1805096) polimorfizmi için ARMS-PZR metodu tercih edildi.

ARMS-PZR; Nokta mutasyonlarının saptanması için geliştirilmiş bir PZR tekniğidir. Teknikte mutant olan ve olmayan nükleotidler, 3’ uçları bu nükleotidlerle çakışacak şekilde tasarlanmış primer çiftlerinin kullanıldığı PZR işlemi ile ayırt edilir. Bu primerlerden birinin terminal 3’ nükleotidi mutant nükleotide, diğerininki ise mutant olmayan nükleotide spesifiktir. Çalışmada toplam 4 primer kullanıldı, bunlardan 2 tanesi fasta dizisine uygun ileri ve geri primer olarak en dıştan (outer) tasarlanan ortak primerlerdi. Diğer 2 tanesi fasta dizisine uygun ileri ve geri primer olarak SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ’in değişim bölgesine uygun olarak en içten (inner) tasarlanan primerlerdi. Bir tanesi normal diziye spesifik iken diğeri mutant diziye spesifikti. İçteki primerler SNP’teki biallelik değişme uygun 2. nükleotid bilerek spesifikliği arttırmak için yanlış tasarlandı. Bu metod enzim

kullanılmasını gerektirmediği için RFLP'ye göre daha ucuzdur, çok daha kısa bir sürede tek bir PZR yaparak genotipleri elde etmek mümkündür. Çalışmada kullanılan ARMS primerleri http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html adresindeki online primer tasarlama programı ile tasarlandı. Dışardan ileri primer ile içerden geri primer çifti mutant alleli (254 bç) gösteren PZR ürününü, içerden ileri primer ile dışarıdan geri primer çifti normal alleli (215 bç) gösteren PZR ürününü oluşturdu. En dıştaki ileri ve geri primerler total (415 bç) PZR ürününü verdi. Pro1019Pro ARMS-PZR analizinde homozigot yabanil genotip varlığında 415 ve 215 bç'i uzunluğunda iki DNA bandı gözlendi, homozigot mutant genotip varlığında ise 254 bç'lik tek DNA bandı elde edildi. Heterozigot genotip varlığında ise 415, 254 ve 215 bç'lik üç DNA bandı gözlendi. ARMS-PZR'ın ardından sonuçlar %2'lik agaroz jelde görüntülendi. Analiz sonucunda çalışma grubunu oluşturan bireylerin homozigot TT, heterozigot TC ve homozigot CC genotiplerini taşıyıp taşımadıkları değerlendirildi.

Tasarlanan ARMS primerleri;

İleri içten primer: 5'-GAGCTATTAGAGAAAGAATCCTTC*(C)*AT-3' Tm: 60 ^{0}C

Geri içten primer: 5'-AGTGCTTCTCTAGCAAAAATTCT*(A)*CG-3' Tm: 60 ^{0}C

İleri dıştan primer: 5'-AGTCAAAAGCACACCACTCTCTCT-3' Tm: 60 ^{0}C

Geri dıştan primer: 5'-CCAGTTCAACAGTGTTAACTTCTCTG-3' Tm: 60 ^{0}C

ARMS-PZR, çizelge 2.5'de her bir örnek için miktarları ve konsantrasyonları verilen 25 ul reaksiyon hacminde ve reaksiyon koşullarında çalışıldı. ARMS-PZR çalışması için peQLab-primus 96 advanced marka cihaz kullanıldı. PZR koşulları da çizelge 2.6' da verildi.

Çizelge 2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu içeriği.

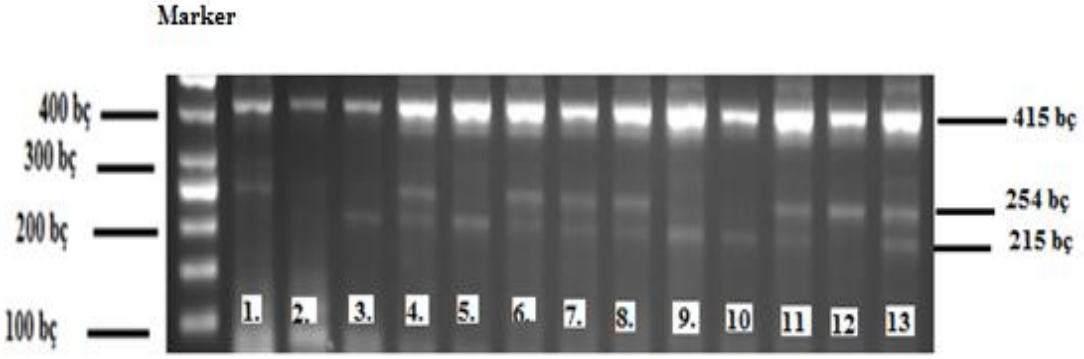
Stok	**25µl İçin Kullanılan**	**Son Konsantrasyon**
10X tampon	2.5 µl	1X
2.5mM dNTP	1.6µl	10mM
İleri içten primer (100ng/µl)	0.14 µl	50 pmol/ul
Geri içten primer (100ng/µl)	0.14 µl	50 pmol/ul
İleri dıştan primer (100ng/µl)	0.14 µl	50 pmol/ul
Geri dıştan primer (100ng/µl)	0.14 µl	50 pmol/ul
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0.8 µl	2,5 U/ul
Genomik DNA	2 µl	50-150 ng/ml
dH2O	15.04µl	
MgCl2	2.5 µl	
TOPLAM	**25 µl**	

Çizelge 2.6. ARMS-PZR koşulları.

Başlangıç Denatürasyonu	**94 ^{o}C**	**8 dakika**
Denatürasyon	94 ^{o}C	1 dakika
Birleşme	59,5 ^{o}C	1 dakika
Uzama	72 ^{o}C	1 dakika
Son Uzama	**72 ^{o}C**	**8 dakika**

2.8.1. Agaroz Jelde Görüntüleme

Jel görüntüsü için %2' lik agaroz hazırlandı. Enzim aktivitesini sonlandırmak ve yükleme yapabilmek için 2 ul yükleme tamponu ve 10 ul ARMS-PZR ürünü karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. 45W akımla 35 dakika yürütüldü. Sonuçları değerlendirmek için UV transilüminatörde jel fotoğraflandı. Şekil 2.3' de görüldüğü gibi bu bölgede 3 farklı fragment görüntülendi.



Şekil 2.3. ARMS-PZR yöntemi ile elde edilen LEPR genine ait Pro1019Pro genotipleri.

2.9. İstatistiksel değerlendirme

Tanımsal istatistik klinik ve biyokimyasal parametreler için uygulandı. Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında bağımsız-t testi uygulandı. Hasta ve kontrol gruplarında genotip dağılımı, allel frekansları ve Hardy-Weinberg değerlendirilmesinde Ki-kare uyum iyiliği (Chi-square goodness fit) testi yapıldı. Analizlerde mutant allellerin etkisini değerlendirmek için kodominant, dominant ve resesif modeller kullanıldı. Dominant modelde homozigot yabanil tip bireyler diğerleri ile; resesif modelde de homozigot mutant bireyler diğerleri ile karşılaştırıldı. Analizlerde SPSS versiyon 15 kullanıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak $P<0,05$ düzeyinde anlamlı kabul edildi.

2.10. Etik Kurul Onayı

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan "Leptin Reseptör Geni (Pro1019Pro) ve Nöropeptid Y geni (Leu7Pro) Polimorfizmlerinin OSAHS (Obstructive Sleep Apnoea/Hipoapnoea Syndrome) ile ilişkisi" başlıklı bu çalışma 28.04.11 tarihli ve 2011/126 sayılı kararı ile etik kurul onayı almıştır.

3.BULGULAR

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Uyku Laboratuarına başvuran OSAHS'lı 153 hasta ve 38 sağlıklı kontrol değerlendirmeye alındı. Bütün hasta ve kontrol grupları önce boy (cm), kilo (Kg), BMI (m^2/kg), AHI (olay/saat), boyun çevresi (cm), bel çevresi (cm), sistolik kan basıncı (mmHg), $\%O_2$ Saturasyonu, Epworth uykululuk skalası değerleri ile karşılaştırıldı (Çizelge 3.1). Hasta ve kontrol grupları arasında kolesterol, trigliserit, HDL, LDL, diastolik kan basıncı (mmHg) değerleri anlamlı değildi. Bu nedenle bu parametreler çizelgede de gösterilmedi.

Çizelge 3.1. Hasta ve Kontrol gruplarında LEPR geni Pro1019Pro ve NPY geni 1128T>C polimorfizmine ait Yaş, BMI ve PSG karakteristiklerine ait değerler (ortalama ± standart sapma).

	Hasta (n=153)	**Kontrol (n=38)**	**P değeri**
Yaş	48.02 ± 9.9	42.72 ± 9.6	0,003
Kilo	90.66 ± 13.9	77.13 ± 9.1	<0,001
BMI(Kg/m^2)	30.43 ± 4.4	25.93 ± 2.4	<0,001
Apne/Hypoapne İndeksi	38.61 ± 24.7	2.78 ± 1.9	<0,001
Boyun çevresi (cm)	42.49 ± 2.9	39.72 ± 2.1	<0,001
Bel çevresi (cm)	107.62 ± 12.6	96.53 ± 7.4	<0,001
Sistolik kan basıncı	126.60 ± 17.7	118.59 ± 16	0,01
SpO_2, %	89,77 ± 5,5	93,44 ± 2,4	<0,001
Epworth uykululuk skalası	10,13 ± 5,9	7,51 ± 5,2	0,01

3.2. LEPR Genindeki Pro1019Pro Polimorfizminin Hasta ve Kontrol Gruplarında Karşılaştırılması

Hasta ve kontroller arasında genotip dağılımları ve allel freakansları değerlendirildi (Çizelge 3.2). Hasta ve kontrol grupları ile dominant model arasında anlamlı bir farklılık vardı. Dominant modelde, en az bir C alleli taşıyan bireyler hasta grubunda daha büyük bir orana sahipti.

Çizelge 3.3.' te hasta bireylerde hastalığın şiddetini gösteren AHI ve obezite göstergesi olarak kullanılan BMI değerlerine göre ayrılmış gruplar ile genetik modeller arasında fark yoktu.

Çizelge 3.4. ' te hasta bireylerde klinik ve biyokimyasal parametreler kodominant modelde karşılaştırıldı. Kodominant modelde genotipler arasında değerlendirilen parametreler açısından yaş değişkeni hariç fark gözlenmedi.

Çizelge 3.5. ' de hasta bireylerde dominant modelde genotipler arasında değerlendirilen klinik ve biyokimyasal parametrelerden yaş ve diastolik kan basıncı değişkenleri istatistiksel olarak farklıydı. Resesif modelde ise genotipler arasında değerlendirilen tüm değişkenlerde böyle bir fark gözlenmedi.

Çizelge 3.2. Pro1019Pro polimorfizminde hasta ve kontrol grupları arasında birey sayıları ve genotip dağılım sıklık değerleri.

Pro1019Pro	**KoDominant Model**			**Dominant Model**		**Resesif Model**		**Allel**	
	TT	**TC**	**CC**	**TT**	**TC+CC**	**TT+TC**	**CC**	**T**	**C**
Hasta	23 15.0	88 57.5	42 27.5	22 14.4	131 85.6	110 71.9	43 28.1	134 43.8	172 56.2
Kontrol	12 31.6	18 47.4	8 21.1	12 31.6	26 68.4	30 78.9	8 21.1	42 55.3	34 44.7
X^2 / P	5.589 / 0.06			6.154 / **0.01**		0.773 / 0.38		3.23 / 0.07	

Çizelge 3.3. Pro1019Pro polimorfizminde hasta gruplarında AHI ve BMI'ya göre ayrılmış alt grupların genetik modellerle karşılaştırılması (%=yüzdelik dilim).

OSAHS Pro1019Pro	**AHI Grup**			χ^2 **/ P**	**BMI Grup**		χ^2 **/ P**
	Hafif	**Orta**	**Ağır**		**Obez OSAS**	**Non Obez OSAS**	
TT	4 17,4%	9 39,1%	10 43,5%	2,859 / 0,58	14 60,9%	9 39,1%	0.760 / 0.68
TC	16 18,4%	20 23,0%	51 58,6%		49 55,7%	39 44,3%	
CC	9 21,4%	10 23,8%	23 54,8%		21 50,0%	21 50,0%	
TT	4 18,2%	8 36,4%	10 45,5%	1.608 / 0.45	14 63,6%	8 36,4%	0.792 / 0.49
TC+CC	25 19,2%	31 23,8%	74 56,9%		70 53,4%	61 46,6%	
TT+TC	19 17,4%	29 26,6%	61 56,0%	0.717 / 0.70	62 56,4%	48 43,6%	0.338 / 0.59
CC	10 23,3%	10 23,3%	23 53,5%		22 51,2%	21 48,8%	

Çizelge 3.4. Pro1019Pro polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin kodominant modelde karşılaştırılması (Ort=ortalama, SS= Standart hata, N=Birey sayısı).

OSAHS Kodominant	**TT (N=23)**	**TC (N=88)**	**CC(N=42)**	
	Ort ± SS	**Ort ± SS**	**Ort ± SS**	**P**
Yaş	52,65±10,14	47,44±9,64	45,50±10,00	0.02
Boy	170,87±5,61	173,15±6,34	172,67±6,09	0.29
Kilo	90,17±15,74	91,43±13,65	89,76±14,30	0.80
BMI	30,76±4,51	30,56±4,45	30,10±4,31	0.81
AHI	36,26±23,16	40,49±25,87	36,92±23,75	0.64
Boyun çevresi	42,43±3,07	42,70±3,05	42,38±2,73	0.82
Bel çevresi	107,91±10,03	108,15±13,22	107,19±13,62	0.92
Kolesterol	207,69±37,88	203,94±42,51	195,90±33,74	0.43
Trigliserit	154,47±82,75	182,13±124,12	185,66±99,91	0.52
HDL	39,66±10,63	46,28±44,84	38,78±6,88	0.44
LDL	136,36±31,86	138,71±95,90	119,32±27,51	0.38
Sistolik	130,22±22,88	126,44±17,81	122,98±13,92	0.27
Diastolik	80,00±17,05	75,52±12,00	74,64±10,72	0.23
%O2 Saturasyon	90,64±3,30	89,41±6,39	89,67±4,82	0.65
Epworth	10,00±6,41	9,97±6,06	10,55±5,28	0.86

Çizelge 3.5. Pro1019Pro polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin dominant ve resesif modelde karşılaştırılması (Ort=ortalama, SS= Standart hata, N=Birey sayısı).

Dominant	**TT (N=22)**	**TC+CC (N=131)**	
	Ort ± SS	**Ort ± SS**	**P değeri**
Yaş	52,14±10,06	46,95±9,84	0.02
Boy	170,95±5,73	172,96±6,23	0.15
Kilo	90,77±15,84	90,79±13,83	0.99
BMI	30,93±4,54	30,38±4,39	0.59
AHI	36,56±23,65	39,26±25,09	0.63
Boyun çevresi	42,55±3,09	42,58±2,94	0.95
Bel çevresi	108,45±9,91	107,75±13,29	0.81
Kolesterol	207,27±38,72	201,44±39,78	0.52
Trigliserit	152,13±83,91	183,46±115,97	0.22
HDL	39,76±10,87	43,79±36,99	0.61
LDL	136,27±32,60	132,39±80,20	0.82
Sistolik	131,14±22,98	125,19±16,66	0.14
Diastolik	80,91±16,87	75,12±11,60	0.04
%O2 Saturasyon	90,48±3,29	89,53±5,90	0.47
Epworth	10.31±6.37	10.09±5.82	0.87

Resesif	**TT+TC (N=110)**	**CC (N=43)**	**P değeri**
	Ort ± SS	**Ort ± SS**	
Yaş	48,47±9,96	45,70±9,96	0.12
Boy	172,72±6,25	172,56±6,06	0.88
Kilo	91,09±14,08	90,00±14,21	0.66
BMI	30,56±4,44	30,22±4,34	0.67
AHI	39,88±25,25	36,31±23,81	0.42
Boyun çevresi	42,63±3,05	42,44±2,72	0.72
Bel çevresi	108,00±12,60	107,46±13,57	0.81
Kolesterol	204,32±41,41	197,13±34,31	0.31
Trigliserit	176,22±117,43	185,76±98,71	0.63
HDL	44,94±40,39	38,81±6,80	0.32
LDL	137,91±86,63	120,52±28,30	0.20
Sistolik	127,29±19,00	122,91±13,76	0.17
Diastolik	76,42±13,31	74,77±10,63	0.46
%O2 Saturasyon	89,62±5,93	89,74±4,79	0.90
Epworth	9.92±6.11	10.65±5.26	0.49

3.3. NPY Genindeki 1128T>C Polimorfizminin Hasta ve Kontrol Gruplarında Karşılaştırılması

Hasta ve kontroller arasında genotip dağılımları ve allel freakansları değerlendirildi (Çizelge 3.6). Çalıştığımız populasyonda homozigot mutant genotipe sahip bireyler olmadığından dolayı resesif genetik model değerlendirmeye alınmadı. Hasta ve kontrol grupları arasında genetik modeller ve allel frekansları açısından fark bulunmadı.

Hasta bireylerde hastalığın ağırlık derecesini gösteren AHI ve obezite göstergesi olarak kullanılan BMI değerlerine göre ayrılmış gruplar ile genetik modeller arasında fark yoktu (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.8‘ e göre hasta bireylerde klinik ve biyokimyasal parametreler kodominant modelde karşılaştırıldı. Kodominant modelde genotipler arasında değerlendirilen parametrelerden BMI, AHI, boyun çevresi, açısından istatistiksel olarak fark vardı.

Hasta bireyler dominant modelde de genotipler arasında değerlendirilen parametrelerden BMI, AHI, boyun çevresi, açısından istatistiksel olarak farklıydı Çizelge (3.9).

Resesif model; CC genotipine ait bireyler olmadığı için değerlendirmeye alınmadı.

Farklı ülkelerde NPY geni 1128T>C nükleotid değişiminin genotip dağılımı ve Tuşgül (2011) tarafından Türkiye’de yapılan çalışmaya ilave olarak bizim çalışmamızın kontrol grubuna ait sonuçları çizelge 3.10’da verildi.

Çizelge 3.6. 1128T>C polimorfizminde hasta ve kontrol grupları arasında birey sayıları ve genotip dağılım sıklıkları.(N= birey sayısı, %= yüzdelik dilim).

Leu7Pro	**Kodominant Model**						**Dominant Model**				**Allel**			
	TT		**TC**		**CC**		**TT**		**TC+CC**		**T**		**C**	
	N	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
Hasta	143	92.9	11	7.1	0	0	143	92.9	11	7.1	300	96.5	11	3.5
Kontrol	34	91.9	3	8.1	0	0	34	91.9	3	8.1	71	95.9	3	4.1
X^2 / P	0.041 / 0.737						0.041 / 0.737				0.46 / 0.738			

Çizelge 3.7. 1128T>C polimorfizminde hasta gruplarında AHI ve BMI'ya göre ayrılmış alt grupların genetik modellerle karşılaştırılması. (%= yüzdelik dilim).

OSAS_leu 7Pro	**AHI Grup**			**χ^2 / P**	**BMI Grup**		**χ^2 / P**
	Hafif	**Orta**	**Ağır**		**Obez OSAS**	**Non Obez OSAS**	
TT	29 20.4%	37 26,1%	76 53,5%	3,778 / 0,151	82 57.3%	61 42.7%	3.735 / 0,053
TC	0 0%	3 27.3%	8 72.7%		3 27.3%	8 72.7%	
TT	29 20.4%	37 26,1%	76 53,5%	3,778 / 0,151	82 57.3%	61 42.7%	3.735 / 0,053
TC+CC	0 0%	3 27.3%	8 72.7%		3 27.3%	8 72.7%	

Çizelge 3.8. 1128T>C polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin kodominant modelde karşılaştırılması (Ort=ortalama, SS= Standart hata, N=Birey sayısı).

Leu7Pro Kodominant	**TT (N=143)**	**TC (N=11)**	
	Ort ± SS	**Ort ± SS**	**P değeri**
Yaş	47,73±9,64	47,09±13,83	0,84
Boy	172,44±6,21	175,36±5,10	0,13
Kilo	91,49±14,25	84,45±11,20	0,11
BMI	30,78±4,50	27,52±2,89	0,02
AHI	37,60±24,19	53,49±28,94	0,04
Boyun çevresi	42,72±2,91	40,55±2,84	0,02
Bel çevresi	108,32±13,01	100,81±7,20	0,06
Kolesterol	202,72±39,18	190,70±49,69	0,36
Trigliserit	180,20±114,34	175,20±76,68	0,89
HDL	43,77±35,29	34,42±14,20	0,41
LDL	132,94±77,08	124,60±40,20	0,74
Sistolik	126,55±17,77	124,55±19,67	0,72
Diastolik	76,41±12,29	73,18±17,64	0,42
%O2 Saturasyon	89,55±5,76	91,55±2,25	0,26
Epworth	10,27±5,92	8,91±5,44	0,46

Çizelge 3.9. 1128T>C polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin dominant modelde karşılaştırılması (Ort=ortalama, SS= Standart hata, N=Birey sayısı).

Leu7Pro	**TT (N=143)**	**TC+CC (N=11)**	
Dominant	**Ort ± SS**	**Ort ± SS**	**P değeri**
Yaş	47,73±9,64	47,09±13,83	0,84
Boy	172,44±6,21	175,36±5,10	0,13
Kilo	91,49±14,25	84,45±11,20	0,11
BMI	30,78±4,50	27,52±2,89	0,02
AHI	37,60±24,19	53,49±28,94	0,04
Boyun çevresi	42,72±2,91	40,55±2,84	0,02
Bel çevresi	108,32±13,01	100,81±7,20	0,06
Kolesterol	202,72±39,18	190,70±49,69	0,36
Trigliserit	180,20±114,34	175,20±76,68	0,89
HDL	43,77±35,29	34,42±14,20	0,41
LDL	132,94±77,08	124,60±40,20	0,74
Sistolik	126,55±17,77	124,55±19,67	0,72
Diastolik	76,41±12,29	73,18±17,64	0,42
%O2 Saturasyon	89,55±5,76	91,55±2,25	0,26
Epworth	10,27±5,92	8,91±5,44	0,46

Çizelge 3.10. Farklı ülkelerde NPY geni 1128T>C nükleotid değişiminin genotip dağılımı ve C allel sıklıkları ile bağımsız iki oran karşılaştırma testi P değerleri.

Ülkeler	S	Genotip				
		TT	TC	CC	C Allel Sıklığı	*P*
Kore	242	242	0	0	0,000	0,076
Japonya	373	373	0	0	0,000	0,022
Avrupa	1171	1078	92	1	0,036	0,829
Afrika	65	65	0	0	0;000	0,634
Brezilya	331	313	18	0	0,027	0,527
İsveç	572	527	45	0	0,039	0,805
Finlandiya	2176	1920	250	6	0,060	0,691
Hollanda	356	331	25	0	0,035	0,214
Çin	304	303	1	0	0,002	0,859
Türkiye*	100	95	5	0	0,025	-
Türkiye**	38	34	4	0	0,041	-

*Tuşgül (2011) Yüksek lisans Tez çalışmasındaki genotip oranları.
**Bizim çalışmamızdaki kontrol grubuna ait genotip oranları.
Diğer ülkelere ait veriler Ding'den (2003) uyarlanmıştır.

4. TARTIŞMA

Obstrüktif uyku apne sendromu üst solunum yolunun daralması nedeniyle solunumun periyodik azalması ya da durması ile karakterizedir. Mevcut OSAHS'lı hastaların %40-90'ı obezdir. OSAHS ve obezite hipoventilasyon, hiperleptinemi ve insülin direnci gibi birçok patofizyolojik mekanizmayı paylaşır. OSAHS için en kuvvetli risk faktörlerinin erkek cinsiyeti ve obezite olduğu bildirilmektedir (Reddline ve Tishler 2000).

Hayvan modelleri ve insan çalışmaları leptin ve leptin reseptörünün obezite mekanizmalarında güçlü rolü olduğunu ortaya koymuştur. Adipöz dokulardan salınan peptid hormonunun oluşturduğu primer sinyal vasıtasyla beynin besin durumu ve enerji depolarının miktarı ile ilgili bilgileri aldığı düşünülmektedir. Leptin hormonu hipotalamusta leptin reseptörüne bağlanır ve oreksijenik nöropeptidlerden NPY' nin salınımını modüle ederek enerji harcanması ve besin alınımını düzenler (Mattevi ve ark 2002).

Leptin sinyalinin kaybı insanda şiddetli obeziteye neden olur ve dolaşımdaki leptin konsantrasyonu BMI ile pozitif ve güçlü bir ilişkiye sahiptir (Considine ve ark 1996, Clement ve ark 1998). Bununla uyumlu olarak dolaşımdaki leptin OSAHS'lı hastalardada artar ve OSAHS'ın şiddetiyle bağlantılıdır (Ulukavak ve ark 2005).

Obezitenin patofizyolojisinde önemli olan Leptin ve Leptin reseptör genlerinin varyantları son yıllarda yaygın olarak çalışılmıştır. Daha az çalışılmasına rağmen NPY vücutta aşırı yağ birikimi duyarlılığına başlıca aday gen olarak gösterilmiştir (Mattevi ve ark 2002).

Kallio ve ark (2001), yaptıkları bir çalışmada Leu7/Leu7 (TT) genotipli bireylerle Leu7/pro7 (TC) genotipli bireyleri karşılaştırdıklarında heterozigot genotipli bireylerin fizyolojik strese yanıtta plazma NPY seviyesinin ortalama %42 arttığını saptamışlardır.

Yaptığımız çalışmada hasta ve kontroller arasında yaş, kilo, BMI, AHI, boyun çevresi, bel çevresi, sistolik kan basıncı, epworth uykululuk skalası; hasta grubunda ölçülen parametrelerin ortalamalarının daha yüksek; % O2 saturasyonunun daha düşük olduğu gözlendi ve bu parametreler istatistiksel açıdan da anlamlıydı. Boy, lipid paneli ve diastolik kan basıncı değerleri iki grup arasında farklı değildi.

Literatürde OSAHS ile ilgili çok çalışma vardır; ancak LEPR Pro1019Pro polimorfizmine ait genotip sıklıkları ile ilgili bir çalışmaya rastlamadık. Bu polimorfizmle ilgili çoğunlukla obezite çalışmalarından elde edilen veriler bulunmaktadır. Guizar-Mendoza ve ark (2005), Mattevi ve ark (2002), Gotoda ve ark (1997) çalışmalarında obez hastalar ve kontroller arasında genotip sıklığı ve allel frekansları açısından bir fark bulmamışlardır. Çalışmamızda hasta ve kontroller arasında dominant modelde genotip frekanslarında farklılık vardı. Hasta grubunda en az bir mutant allel taşıyan birey sayısı daha fazlaydı. Bu durum, mutant alleli taşıyan bireylerin hastalığa daha yatkın olabileceğini düşündürdü.

OSAHS'lı hastaların dahil olduğu analizlerde AHI ve BMI'i alt grupların genetik modellerle yapılan genotip frekanslarının karşılaştırılmasında herhangi bir istatistiksel farklılık bulamadık. OSAHS'ın bu polimorfizme ait genotiplerle, hastalığın ciddiyetini gösteren AHI ve obezite göstergelerinden biri olan BMI ile bir ilişkisi olmadığını düşündük.

Çin populasyonunda LEPR genindeki Pro1019Pro polimorfizmi için 961 obez, 818 sağlıklı kontrol; Gln223Arg polimorfizmi için ise 1096 obez, 949 sağlıklı kontrol bireyle yapılan çalışmada obezite riski ile polimorfizmler arasında istatistiksel açıdan ilişki bulunmuştur. Bu çalışmada LEPR genindeki Gln223Arg polimorfizmi ile azalan obezite arasında önemli bir ilişki bulunurken; LEPR genindeki Pro1019Pro polimorfizmi ile obezite riskinin artışı arasında önemli bir ilişki ortaya konmuştur (Yang ve ark 2011). Avustralya populasyonunda, de Silva ve ark (2001)'nın, obez ve nonobez 335 kadınla yaptıkları çalışmada ise LEPR Pro1019Pro polimorfizmi ile vücut ağırlığı ($p= 0,02$), yağ kütlesi ($p= 0,05$) ve BMI ($p= 0,01$) artışı arasında ilişki bulunmuş ve bu lokusta homozigot C allelini taşıyan bireylerin zaman içerisinde vücut yağı artışına daha çok eğilimli oldukları bildirilmiştir. Rosmond ve ark (2000) LEPR genindeki varyasyonların hipertansiyonla ilişkili olabileceğini hatta hipertansiyondan koruyucu bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda Pro1019Pro polimorfizmi ile sistolik ve diastolik kan basınçları arasında bir ilişki yoktu. OSAHS' lı hastalarda genotipler arasında diğer klinik ve biyokimyasal parametreler açısından bir farklılık bulamadık.

NPY ve OSAHS arasında ilişkiyi gösteren literatürde bulabildiğimiz tek çalışma Bhushan ve ark (2011)'nın yaptığı Hint populasyonunda 252 obez (BMI>25 kg/ m²) bireyden, 142'si OSAHS' lı, 110' u OSAHS' lı olmayan bireyde NPY genindeki 1128T>C (Leu7Pro) polimorfizm ile ilgili çalışmadır, sonuçta C varyant allelinin dağılımının bu iki grup arasında önemli bir farklılık oluşturmadığını gözlemlemişlerdir. Yeung ve ark (2011) 1128T>C polimorfizmini 2071 kadın ve 1268 erkekte çalışmışlardır. Minör allel sıklığı %4 olan 1128T>C polimorfizmi her iki grupta da artmış obezite riski ile ilişkili bulmuşlardır. Makino ve ark (2001), Japon populasyonunda yaşları 20-56 arasında değişen 102 sağlıklı bireyde NPY genindeki T1128C polimorfizmini taramışlardır. Leu7/Leu7 homozigot allelini 102 bireyin tamamında gözlemlerken, Leu7/Pro7 heterozigot genotipi ve Pro7/Pro7 homozigot genotipini hiç bir bireyde tespit edememişlerdir. Mattevi ve ark (2002) Leu7/Pro7 heterozigot genotipi düşük frekansta gözlerken; Pro7/Pro7 homozigot genotipini hiçbir bireyde gözlemlememişlerdir. Karvonen ve ark (1998) Finlandiya ve Almanya populasyonlarında yaptıkları çalışmada ise Pro7 allelinin sıklığını Finli erkeklerin %8'inde, Alman erkeklerinin %3'ünde bulduklarını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da Mattevi ve ark (2002), Makino ve ark'nın (2001) yaptıkları çalışmalara uyumlu olarak hem hasta hem de kontrollerde Leu7/Pro7 heterozigot genotipini düşük frekansta gözlemlerken, Pro7/Pro7 homozigot genotipini hiçbir bireyde gözlemlemedik. Yaptığımız bu çalışmanın sonuçları çizelge 3.10'da verilen farklı ülkelerde NPY geni 1128T>C nükleotid değişiminin genotip dağılımı ile uyumludur. Obez-OSAHS ve zayıf-kontrol gruplar arasında genotip dağılımları ve frekansları arasında istatistiksel olarak fark yoktu.

Yeung ve ark (2011) mutant C allelini taşıyan bireylerin taşımayanlardan daha yüksek BMI'ine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Mattevi ve ark BMI'ye göre ayrılmış obez ve nonobez gruplar ile genotip frekansları arasında herhangi bir farklılık bulmamışlardır. Bizde Mattevi ve ark ile uyumlu olarak obez ve obez olmayan grup ile genotip frekansları arasında fark bulamadık. AHI derecesine göre sınıflandırılmış grup ile genotip frekansları arasında da bir farklılık bulamadık.

Aryrıca Yeung ve ark (2011), Mattevi ve ark (2002) tarafından yapılan her iki çalışmada da bel çevresi, BMI ile genotipler arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda ise Homozigot yabanil genotip ve heterozigot genotipe sahip bireylerin BMI, AHI ve boyun çevresi arasında farklılık vardı. Bu genotipler ile diğer klinik ve biyokimyasal parametreler arasında farklılık bulamadık.

5.SONUÇ ve ÖNERİLER

LEPR Pro1019Pro polimorfizminde OSAHS ve kontrol grupları arasında hastalarda mutant alleli taşıyan bireylerin sayısının daha fazla olduğunu gözlendi. Bu mutant alleli taşıyanlar OSAHS' a daha yatkın olabilir; ancak hastalığın şiddetini belirleyen AHI derecesinin değerlendirilmesinde doğrudan bir ilgisi olmayabilir. Ayrıca Pro1019Pro polimorfizminin obezite ile ilgili saptayabildiğimiz bir ilişkisi yoktu.

Çalıştığımız populasyonda NPY genindeki 1128T>C polimorfizmine ait genotiplerden homozigot mutant olan birey yoktu. İstatistiksel analizler diğer iki genotip üzerinden yapıldı. Bu polimorfizm BMI ve boyun çevresinde ki değişimi etkileyebilir buna bağlı olarakta hastalığın seyrini değiştirebilir. Daha önce NPY ile ilgili yapılan çalışmalarda bu molekülün oldukça korunmuş olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle NPY ile ilgili olduğu düşünülen hastalıklarda buradaki varyasyonların büyük bir risk oluşturabileceği tahmin edilmektedir. OSAHS gibi multifaktöriyel hastalıklarda genetik temelin belirlenmesi için benzer çalışmaların yaygınlaşmasına ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEPTİN RESEPTÖR GENİ VE NÖROPEPTİD Y GENİ POLİMORFİZMLERİNİN OSAHS İLE İLİŞKİSİ

İLKNUR ÇINAR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2012

Obstrüktif Uyku Apnesi obezlerde yaygındır. Leptin Metabolik kontrolde önemli rolü olan, adiposit kaynaklı bir sinyal faktörüdür. Hipotalamik nöropeptid Y'nin ekspresyonu ve salınımını leptin aracılığıyla inhibe eder. Bu çalışmada OSAHS'ın leptin reseptör (LEPR) ve nöropeptid Y (NPY) gen polimorfizmleri ile arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Çalışmaya Konya popülasyonundan cinsiyeti erkek 153 hasta ve 38 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu dahil edilmiştir. Bütün hasta ve kontrol bireylerine polisomnografi testi uygulanmıştır. Pro1019Pro and Leu7Pro (T1128C) polymorphismlerinin obeziteye etkisini görebilmek için Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta alt grupları oluşturulmuştur. Gruplar, genotip dağılımı; yaş, BMI (Body Mass İndex), boyun ve bel çevresi, AHI (Apne Hipoapne İndeksi), Total Kolesterol, Trigliserit, HDL (High-density lipoprotein), LDL (Low-density lipoprotein), Kan basıncı (Sistolik ve Diastolik), SpO_2 (Oksijen saturasyonu) ve Epwort Uykululuk skalası değişkenleri ile karşılaştırılmıştır. T1128C polimorfizmi için bireylerin genotipleri PZR-RFLP yöntemi ile belirlenirken, Pro1019Pro polimorfizmi için ise ARMS-PZR yöntemi kullanılmıştır.

Hasta ve kontroller arasında Pro1019Pro polimorfizmine ait dominant modelde genotip frekanslarında farklılık vardı. OSAHS' ın Pro1019Pro polimorfizmine ait genotiplerle, hastalığın ciddiyetini gösteren AHI ve obezite göstergelerinden biri olan BMI ile bir ilişkisi olmadığını saptadık. Obez-OSAS ve zayıf-kontrol gruplar arasında T1128C polimorfizmine ait genotip dağılımları ve frekansları arasında istatistiksel olarak fark yoktu. T1128C polimorfizmine ait Homozigot yabanil genotip ve heterozigot genotipe sahip bireylerin BMI, AHI ve boyun çevresi arasında farklılık vardı. Bu genotipler ile diğer klinik ve biyokimyasal parametreler arasında farklılık bulamadık.

Sonuç olarak Pro1019Pro ve T1128C polimorfizmi ile OSAHS arasında bir ilişki saptanmadı. Leptin reseptörü ve NPY geninde belirlenmiş diğer polimorfizmlerin moleküler tarama yöntemleri kullanılarak yeteri kadar veri bulunmayan Türk populasyonunda leptin reseptörü ve Nöropeptid Y'nin OSAHS gelişimine etkisinin araştırılması uygun olacaktır.

Anahtar Sözcükler: OSAHS; LEPR; NPY; Polimorfizm; PZR.

7. SUMMARY

ASSOCIATION OF THE LEPTIN RECEPTOR GENE AND NEUROPEPTIDE Y GENE POLYMORPHISMS WITH OSAHS

Obstructive sleep apnea is common in obese. Leptin is an adipocyte-derived signaling factor that has an important role in metabolic control. The expression and release of hypothalamic neuropeptid Y are inhibited by leptin. İn this study was to investigate the relation betwen polymorphisms of the leptin receptor (LEPR), neuropeptid Y (NPY) gene polymorphisms and OSAS.

The study population consisted of 153 patients with OSAS and 38 healty control subjects who were all male. All the subjects were Konya population. Diagnostic polysomnography was performed in all patients and control subjects. To see the effect on obesity of Pro1019Pro and Leu7Pro (T1128C) polymorphisms were constituted into two subgroups of Weak/Patiens and Obese/Patients. The results between both groups and distributions of genotyping were compared with data of ages, BMI (Body Mass Index), neck and waist circumference, AHI (Apnea Hypoapnea Index), total cholesterol, triglyceride, HDL (High-density lipoprotein), LDL (Low-density lipoprotein), blood pressure, SpO_2 (saturation of oxygen) and Epworth Sleepiness Scale. For Pro1019Pro, ARMS-PZR method has been used while T1128C individuals' genotypes are determined by PZR-RFLP method.

There were differences in genotype frequences between the patient and control groups in the dominant model of Pro1019Pro polymorphism. We have detected that there is not connection among genotypes that belong to OSAHS Pro1019Pro polymorphism and AHİ that shows the signifigance of the illness and BMI is the indicator of obesity. There were not differences between OSAHS with obesity and weak conrol groups, between genotypes that belong to polymorphism and frequencies divisions in terms of statistics. There were differences in individuals' BMI, AHI and neck circumference that have homozygote wild type of T1128C polymorphism and heterozygote genotype. We could not find differences in these individuals' and other clinic and parametres.

As a result, it has not been determined a relevance among Pro1019Pro and T1128C polymorphism and OSAHS. It is recommended that, in Turkish populaton that has not had sufficient data, by carrying out molecular screening method polymorphisms that have been determined in LEPR and NPY gene's, LEPR and NPY gene's effects should be investigated on the development of OSAHS.

Key Words: OSAHS; LEPR; NPY; Polymorphism; PZR.

8. KAYNAKLAR

1. Ahima RS, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature. 1996; 382, 250-2.

2. Ahima SR, Kelly J, Elmquist KJ, and Flier SJ. Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. Endocrinology. 1999; 140: 4923-31.

3. Barış Yİ, Obstrüktif sleep apne sendromunun tarihçesi. In: Barış Yİ (ed). Obstrüktif Sleep Apne Sendromu. Ankara, Kent matbaacılık. 1993; 1-4.

4. Barvaux VA, Aubert G, Rodenstein DO. Weight loss as a treatment for obstructive sleep apnoea. Sleep Med Rev. 2000;4:435–452.

5. Baskin DG, Breininger FJ, Schwartz MW. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of NPY neurons activated by fasting in the hypothalamus. Diabetes. 1999; 48: 828-33.

6. Bhushan B, Guleria R, Misra A, Luthra K, Kumar G. Association of PPARγ2 (Pro12Ala) and neuropeptide Y (Leu7Pro) gene polymorphisms with obstructive sleep apnea in obese Asian Indians. Dis Markers. 2011;30(1):31-8. doi: 10.3233/DMA-2011-0762.

7. Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signalling in the central nervous system and the periphery. Recent Prog Horm Res. 59:305-331, 2004.

8. Brabant G, Horn R, Mary M, Wuster U, Schnabel D, Heindenreich F. Free and protein boundleptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. Diabetologia. 43:438-42, 2000.

9. Bresnitz EA, Goldberg R, Kosinski RM. Epidemiology of obstructive sleep apnea. Epidemiol Rev. 1994; 16(2): 210-227.

10. Carek PJ, Dickerson IM. Current concepts in the pharmacological management of obesity. Drugs. 1999; 57(6): 883-904.

11. Chen SH, Cheung RT. Neuropeptide Y and its receptor analogs differentially modulate the immunoreactivity for neuronal or endothelial nitric oxide synthase in the rat brain following focal ischemia with reperfusion. Journal of Biomedical Science. 2005;12(2):267-278.

12. Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. Endocrinology. 1984;115(1):427-429.

13. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. Nature. 1998; 674:398–401.

14. Coleman J. Oral and maxillofacial surgery for the management of obstructive sleep apnea. Otolaryngol Clin North Am. 1999; 32(2): 235-241.

15. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med. 1996; 334:292–295.

16. Danny JE, Malhotra A. Pathophysiology of Adult Obstructive Sleep Apnea. The American Thoracic Society. 2008; 5: 144-153.

17. Deniz G, Saygı Ş. Leptin, Neuropeptide Y and Obesity. T Klin J Med Sci. 2002, 22:217-220.

18. de Silva AM, Walder KR, Boyko EJ, Whitecross KF, Nicholson G, Kotowicz M, Pasco J, Collier GR. Genetic variation and obesity in Australian women: a prospective study. Obes Res. 2001 Dec;9(12):733-40.

19. Ding B. Distribution of the NPY 1128C allele frequency in different populations. J Neural Transm. 2003;110(11):1199-1204.

20. Donahue CP, Prineas R, et al. Is fasting leptin associated with insulin resistance among nondiabetic individuals Diabetes Care. 1999; 22: 1092-6.

21. Flier JS. What's in a name? In search of leptin's physiologic role. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83: 1407-13.

22. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature. 1998; 395: 763-70.

23. Gehlert DR. Role of hypotalamic neuropeptide Y in feding and obesity.Neuropepetides. 1999;33(5):329-338.

24. Goodman A, Neurobiology of addiction.An integrative review, Biochem Pharmacology. 2008;75:236-322.

25. Gotoda T, Manning BS, Goldstone AP, Imrie H, Evans AL, Strosberg AD, McKeigue PM, Scott J, Aitman TJ. Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white British male population. Human Molecular Genetics. 1997; 6(6):869-76.

26. Guilleminault C, Partinen M, Hollman K, Powell N, Stoohs R. Familial aggregates in obstructive sleep apnea syndrome. Chest. 1995; 107:1545-1551.

27. Guizar-Mendoza JM., Amador-Licona N., Flores-Martinez SE., Lopez-Cordona MG., Ahuatzin-Tremary R., Sanchez-Corona J. Association analysis of the Gln223Arg polymorphism in human leptin receptor gene, and traits related to obesity in Mexican adolescents. Journal of Human Hypertension. 2005; 19, 341–346.

28. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Onbirinci basım. İstanbul. Nobel Tıp kitabevleri. 2007. 869.

29. Gülle K, Karagöz E. Leptinler, T klin Tıp Bilimleri. 2000, 20:112-121.

30. Hansel DE, Eipper BA, Ronnett GV. Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. Nature. 2001;410(6831):940-944.

31. Harrington ME, Schak KM. Neuropeptide Y phase advances the in vitro hamster circadian clock during the subjective day with no effect on phase during the subjective night. Can J Physiol Pharmacol. 2000;78(2):87-92.

32. Heilig M, McLeod S, Brot M, Heinrichs SC, Menzaghi F, Koob GF, Britton KT. Anxiolytic-like action of neuropeptide Y: mediation by Y1 receptors in amygdala and dissociation from food intake effects. Neuropsychopharmacology. 1993;8(4):357-363.

33. Hirschberg AI. Hormonal regulation of appetite and food intake. Ann Med. 1998; 30(1): 7-20.

34. Houseknecht KI, Raile CA, Matteri RI, Spurlock MF. The biology of leptin. J Anim Sci. 1999; 76(5): 1405-20.

35. Hökfelt T. Neuropeptides in perspective: the last ten years. Neuron. 1991;7(6): 867-879.

36. Hu Y, Dunbar JC. Intracerebroventricular administration of NPY increases sympathetic tone selectively in vascular beds. Brain Res Bull. 1997; 44: 97-103.

37. Kallio J, Pesonen U, Karvonen MK, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K, Koulu M Enhanced exercise-induced GH secretion insubjects with Pro7 substitution in the prepro-NPY. J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86:5348–5352.

38. Karvonen MK, Pesonen U, Koulu M, Niskanen L, Laakso M, Rissanen A, Dekker JM, Hart LM, Valve R, Uusitupa MI. Association of a leucine(7)-toproline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. Nature Medicine. 1998;4(12):1434-1437.

39. Kasuya E, Mizuno M, Watanabe G, Terasawa E. Effects of an antisense oligodeoxynucleotide for neuropeptide Y mRNA on in vivo luteinizing hormone-releasing hormone release in ovariectomized female rhesus monkeys. Regul Pept. 1998;75-76:319-325.

40. Kayrın L, Aksoy K, Tuli A, Çürük MA, Attila G. Tanıda DNA Teknikleri VI. Biyokimya Yaz Okulu Kitagçıgı, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2003.

41. Köktürk O. Uykuda solunum bozuklukları; tarihçe, tanımlar, hastalık spektrumu ve boyutu. Tüberküloz ve Toraks. 1998; 46: 187-92.

42. Köktürk O. Uykuda solunum bozukluklarının klinik belirtileri. 1. Ulusal Uyku Bozuklukları Kursu, Ankara 1998.

43. Köktürk O. Obstrüktif uyku apne sendromu epidemiyolojisi. Tüberküloz ve Toraks Dergisi 1998; 46: 193-201.

44. Köktürk O. Obstrüktif uyku apne sendromu epidemiyolojisi. Tüberküloz ve Toraks Dergisi 1998; 46 (2): 193-201.

45. Köktürk O. Uyku apne sendromu, tanı yöntemleri. Toraks Derneği 2. yıllık kongresi, Uyku apne sendromu kursu Antalya, 1998.

46. Köktürk O. Uykunun izlenmesi. Polisomnografi. Tüberküloz ve Toraks Dergisi 1999; 47: 499-511.

47. Köktürk O, Yeğin D, Güneş M. Obstruktif uyku apne sendromlu olgularda değerlendirmenin tanı değeri. Toraks Derneği Ulusal Akcğer Sağlığı Kongresi; Antalya 2000 ; 59: 235.

48. Köktürk O. Uykuda solunum bozukluklarının klinik belirtileri. 1. Ulusal Uyku Bozuklukları Kursu, Ankara 1998.

49. Kryger MH, Roth T, Dement WC, eds. Principles and practise of Sleep Medicine. 4th ed. 2005: 1359-77.

50. Lavie P. Incidence of sleep apnea in apresumably heathy working population. Sleep 1983; 6: 312-318.

51. Le Stunff C, Le Bihan C, Schork NJ, Bougneres P. Acommon promoter variant of the leptin gene is associated with changes in the relationship between serum leptin and fat mass in obese girls. Diabetes 2000; 49 :2196-2000.

52. Makino K, Kataoka Y, Hirakawa Y, Ikeda A, Yamauchi A, and Oishi AR. A leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y was not identified in the Japanese population. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 2001;26(3):201-203.

53. Marik PE. Leptin, Obesity, and Obstructive Sleep Apnea. Chest. 2000;118;569-571.

54. Marroquí L, Gonzalez A, Ñeco P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Ripoll C, Nadal A, Quesada I. Role of leptin in the pancreatic β-cell: effects and signaling pathways. J Mol Endocrinol. 2012 May 29;49(1):R9-17.

55. Mattevi VS, Zembrzuski VM, Hutz MH. Association analysis of genes involved in the leptinsignaling pathway with obesity in Brazil. International Journal of Obesity. (2002) 26, 1179–1185.

56. McNamara S. G, Grunstein R. R, Sullivan C. E. Obstructive sleep apnea. Thorax. 1993; 48: 754-763.

57. McNeely JM, Boyko JE, et al. Association between baseline plasma leptin levels and subsequent development of diabetes in Japanese Americans. Diabetes Care 1999; 22: 65-70. Meier U, Gressner AM. Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of Pathobiochemical and Clinical Chemical Aspects of Leptin, Ghrelin, Adiponectin and Resistin. Chinical Chemistry. 2004; 50:9 1511-1525.

58. Mitchell GC, Wang Q, Ramamoorthy P, Whim MD. A common single nucleotide polymorphism alters the synthesis and secretion of neuropeptide Y. J Neurosci. 2008;28(53):14428 –14434.

59. Morales-Medina CJ, Dumont Y, Quirion R. A possible role of neuropeptide Y in depression and stress. Brain Research. 2009;1314:195-205.

60. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via Polymerasecatalyzed chain reaction. Methods In Enzymology. 1987;155:335-350.

61. Najmabadi H, Teimourian S, Khatibi T, Neishabury M, Pourfarzad F, Jalil-Nejad S, Azad M. Amplification Refractory Mutation System (ARMS) and reverse hybridization in the detection of beta-thalassemia mutations. Arch Irn Med. 2001; 4 (4): 165–170.

62. Oguz K, Ciftci TU, Mollarecep E, Ciftci B, Elevated C-Reactive Protein Levels and İncreased Cardiovascular Risk in Patients With Obstructive Sleep Apnea Syndrome. Int Heart J. 2005; 46: 801-809.

63. Pedrazzini T, Seydoux J, Künstner P, Aubert JF, Grouzmann E, Beermann F, Brunner HR. Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. Nat Med. 1998;4(6):722-726.

64. Popko K, Gorska E, Wasık M, Stoklosa A, Plywaczewskı R, Wınıarska M, Gorecka D, Slıwınskı P, Demkow U. Frequency of distrubition of leptin receptor gene polymorphism in obstructive sleep apnea patients. Journal of Physiology and Pharmacology. 2007; 58: 5; 551-561.

65. Popovic RM, White DP. Upper airway muscle activity in anormal woman: Influence hormonal status. J Appl Physiol. 1998; 84(3): 1055-1062.

66. Redline S, Tishler PV. The genetics of sleep apnea. Sleep Medicine. 2000; Reviews, 4(6), 583–602.

67. Richard L, Bradley C, Bentley C. Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. Diabetes. 1999; 48: 272-8.

68. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Pérusse L, Lindell K, Carlsson B, Bouchard C, Björntorp P. Hypertension in Obesity and the Leptin Receptor Gene Locus. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Sep;85(9):3126-31.

69. Rray GA, York DA. The MONA L_SA hypothesis in the time of leptin. Recent Prog Horm Res. 1998; 53: 95-117.

70. Ruige BJ, Decker MJ, et al. Leptin and variables of body adiposity, energy balance, and insulin resistance in a population based study. Diabetes Care. 1999; 22: 1097-104.

71. Schwartz MW, Seeley RS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. J Clin Invest. 1996; 98: 1101-6.

72. Segal KR, Landt M, and Klein S. Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. Diabetes. 1996; 45: 988-91.

73. Shi TJ, Tandrup T, Bergman E, Xu ZQ, Ulfhake B, Hökfelt T. Effect of peripheral nerve injury on dorsal root ganglion neurons in the C57 BL/6J mouse: marked changes both in cell numbers and neuropeptide expression. Neuroscience. 2001;105(1):249-263.

74. Silva AP, Cavadas C, Grouzmann E. Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets. Clin Chim Acta. 2002;326(1-2):3-25.

75. Small CJ, Bloom SR. Gut hormones as peripheral anti obesity targets. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2004;3(5):379-388.

76. Smith P, Gold A, Meyers D, Haponik E, Bleecker E. Weight loss in mildly to moderately obese patients with obstructive sleep apnea. Annals of Internal Medicine. 1985; 103(6pt 1): 850-855.

77. Stradling JR. Obstructive sleep apnea. Definitions, epidemiology and natural history. Thorax. 1995; 50: 683-689.

78. Strobel RJ, Rosen RC. Obesity and weight loss in obstructive sleep apnea: a critical review. Sleep. 1996;19:104–115.

79. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OBR. Cell. 83:1263– 71, 1995.

80. Tartaglia LA. The leptin receptor. J Biol Chem. 272:6093–6, 1997.

81. Thiele TE, Navarro M, Sparta DR, Fee JR, Knapp DJ, Cubero I. Alcoholism and obesity: overlapping neuropeptide pathways Neuropeptides. 2003;37:321-33.

82. Tuşgül F. Esrar bağımlılarında nöropeptid y (npy) geni analizi. Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi; 2011.

83. Ulukavak Ciftci T, Kokturk O, Bukan N, et al. Leptin and ghrelin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. Respiration. 2005; 72:395–401.

84. Wettstein JG, Earley B, Junien JL. Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. Pharmacol Ther. 1995;65(3):397-414.

85. White DP. Pathogenesis of obstructive and central sleep apnea. Am J Respir Crit Care Med. 2005;172:1363–1370.

86. Woldbye DP, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Klemp K, Madsen TG, Bolwing TG. Powerful inhibition of kainic acid seizures by neuropeptide Y via Y5 –liken receptors. Nat Med. 1997;3(7):761-764.

87. Wiegand L, Zwillich C. W. Obstructive sleep apnea. Disease amonth. 1994; 40: 199-252.

88. Yang GP, Peng SH, Zuo SY, Wang YR, Peng XN, Zeng XM. Meta-analysis on the relationship between leptin receptor Gln223Arg and Pro1019Pro gene polymorphism and obesity in the Chinese population. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2011 Oct;32(10):1037-42.

89. Yannielli PC, Harrington ME. Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. Peptides. 2001;22:547-556.

90. Yeung EH, Zhang C, Chen J, Bowers K, Hu FB, Kang G, Qi L. Polymorphisms in the neuropeptide Y gene and the risk of obesity: findings from two prospective cohorts. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Dec;96(12):E2055-62.

91. Yokosuka M, Kalra SP, and Kalra PS. Inhibition of NPY induced feeding and c-fos response in magnocellular paraventricular nucleus by a NPY receptor antagonist: A site of NPY action. Endocrinology. 1999; 140: 4494-500.

92. Yong-Jun Liu, Sonia M.S. Rocha-Sanchez, Peng-Yuan Liu, Ji-Rong Long, Yan Lu, Leo Elze, Robert R. Recker, and Hong-Wen Deng (2004) Tests of linkage and/or association of the LEPR gene polymorphisms with obesity phenotypes in Caucasian nuclear families. Physiol Genomics. 17: 101–106.

93. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman Jm. Positional clonnig of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 372:425-432, 1994.

94. Zhang LQ, Yao WZ,He QY, Wang YZ, Ren B, LinYP. Polymorphism in the beta2 and beta3 adrenergic receptor genes in the obstructive sleep apnea/hypoapnea syndrome. Zhonghua Nei Ke Za Zhi. 2005; 44: 333-336.

9.EKLER

EK-A ETİK KURUL ONAYI

EK-B BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

- Bu çalışma uyku apnesi (OSAHS) olan bireylerde yapılacaktır.
- Çalışma için, gönüllü katılacak bireylerden, rutin alınan periferal kandan EDTA'lı tüplere 5 ml ayrılacaktır. Kan alma işlemi uyku laboratuarı teknisyenleri tarafından ya da kan alma merkezinde uygulanacaktır.
- Yapılacak çalışma size hiçbir mali yükümlülük getirmeyecektir.
- Bu araştırma yaklaşık bir yıl sürecek, bu süre içerisinde ve sonrasında kimliğiniz gizli tutulacak, bilgileriniz ve test sonuçlarınız bilimsel araştırma ve yayınlar dışında kesinlikle kullanılmayacaktır.
- Çalışmaya yaklaşık 200 kişinin katılması hedeflenmektedir.
- Bu çalışma sonucunda size ya da ailenize bir yarar getirip getirmeyeceğini şimdiden söylemek mümkün değildir.
- Çalışma olumlu sonuçlanırsa, hastalıkların moleküler temelini anlamamıza katkıda bulunarak insan sağlığına yararlı olmasını beklemekteyiz.
- Çalışmaya katılma tamamen isteğe bağlıdır. İstediğiniz zaman çalışmaya katılmaktan vazgeçebilirsiniz. Bu durumda sizden almış olduğumuz örnek yok edilecektir.
- Çalışmayla ilgili sorularınız olursa Dr. Şebnem YOSUNKAYA' ya danışabilirsiniz.
  (Tel: 0332 223 61 91)

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih
…../…../……..

Gönüllünün Adı soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon/faks no.)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin.
Adı soyadı, imzası (varsa telefon/faks no.)

Açıklamaları yapan araştırıcının Adı soyadı, İmzası:
Biyolog İlknur ÇINAR

Herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun Adı soyadı, İmzası (varsa telefon/faks no.)
Yrd. Doç. Dr. Şebnem YOSUNKAYA–2236191

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kişinin.
Adı soyadı, İmzası, Görevi

10. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında doğdu. İlköğrenimini Bingöl 100. Yıl ilköğretim okulunda, orta öğrenimini ise Bursa Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Yükseköğrenimine 2005 yılında Selçuk Üniversitesi biyoloji bölümünde başladı ve 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Sağlık bilimleri enstitüsüne bağlı Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2011 yılında aynı anabilim dalına araştırma görevlisi olarak atandı. Hala bu görevine devam etmektedir.