T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA POPÜLASYONUNDA İNSAN LEPTİN RESEPTÖR GENİNDEKİ Gln223Arg POLİMORFİZMİ İLE OSAHS ARASINDA İLİŞKİ ANALİZİ

Serkan KÜÇÇÜKTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Sennur DEMİREL

KONYA-2009

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA POPÜLASYONUNDA İNSAN LEPTİN RESEPTÖR GENİNDEKİ Gln223Arg POLİMORFİZMİ İLE OSAHS ARASINDA İLİŞKİ ANALİZİ

Serkan KÜÇÇÜKTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Sennur DEMİREL

Bu proje Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü

tarafından 09202036 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA–2009

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışmanım Prof. Dr. Sennur DEMİREL'e ve her zaman destek veren bölüm başkanımız Prof. Dr. Ferhan PAYDAK'a,

Tez aşamasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Göğüs Hastalıkları öğretim üyesi ve Uyku Laboratuarı sorumlusu Yard. Doç. Dr. Şebnem YOSUNKAYA'ya,

Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Yard. Doç. Dr. Ercan KURAR ve Prof. Dr. Şeref İNAL'a

Araştırma sırasında bizi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Eğitim ve tez aşamasında bana desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen aileme, arkadaşlarım Figen AKIN, Elif GÜLBAHÇE, Seçkin TUNCER ve Mehmet ÖZ' e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ 1

1.1. Uykuda Solunum Bozuklukları 1

1.2. Uyku Apne Sendromu 1

1.2.1. Epidemiyoloji 2

1.2.2. Etyoloji 3

1.2.3. Klinik Özellikler 3

1.2.4 Polisomnografi (PSG) 4

1.3. Mutasyon ve Polimorfizm 6

1.3.1. Kısa DNA Baz Tekrarları (Short tandem repeat polimorfizm; STRP veya microsatellite) 6

1.3.2. Uzun DNA Baz Tekrarları (Variable Number Tandem Repeats (VNTR); minisatellitler) 7

1.3.3. DNA'nın Tek Bir Bazındaki Değişiklikler (Single nucleotid polymorphisms; SNP).....8

1.3.4. DNA'yı Kesen Enzimlerin Oluşturduğu Uzunluk Polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) 9

1.4. Obezite, Leptin ve Leptin Reseptörü 10

1.4.1 Obezite 10

1.4.2. Leptin 11

1.4.3. Leptin Reseptörü 12

1.5. Amaç 15

2. MATERYAL VE METOD 18

2.1. Hasta Kabulü 18

2.2. Çalışma gruplarının oluşturulması 18

2.3. Hastadan kan alınması 19

2.4. Genomik DNA izolasyonu 19

2.4.1. İzolasyonda kullanılan çözeltiler.....21

2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....22
2.5.1. Agaroz Jelde Görüntüleme 23
2.6. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....24
2.6.1. Agaroz Jelde Görüntüleme 24
2.7. İstatistiksel değerlendirme 25
2.8. Etik Kurul Onayı 25
3. BULGULAR 26
3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması 26
3.2. Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta Alt Gruplarının Karşılaştırılması 30
3.3. Zayıf/Hasta Alt Grubu ve Kontrol Grubunun Karşılaştırılması 32
4. TARTIŞMA 34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 39
6. ÖZET.....40
7. SUMMARY.....41
8. KAYNAKLAR 42
9. EKLER 45
EK-1. BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU 45
10. ÖZGEÇMİŞ 46

SİMGELER VE KISALTMALAR

AHI: Apne/Hipoapne İndeksi

BMI: Body Mass Index

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilendiamintetraasetikasit

EEG: Elektroensefalogram

EKG: Elektrokardiyogram

EMG: Elektromyogram

EOG: Elektrookülogram

EtBr: Etidyum Bromür

EtOH: Etanol

HDL: High-Density Lipoprotein

JAK: Janus-aktive kinaz

LDL: Low-Density Lipoprotein

LEPR: Leptin Reseptörü

mRNA: Messenger RNA

MspI: C|CGG tanıma bölgesine sahip restriksiyon enzimi

NaAc: Sodyum Asetat

NPY: Nöropeptid Y

Ob gen: obezite geni

OB-Ra: Kısa reseptör

OB-Rb: Uzun reseptör

OD: Optik Dansite

OSAHS: Obstructive Sleep Apnes/Hypoapnes Syndrome

pmol: pikomol

PSG: Polisomnografi

PZR: Polimeaz Zincir Reaksiyonu

Q=Gln: Glutamin

R=Arg: Arginin

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA: Ribonükleik asit

SDS: Sodyum dodesil sülfat

SNP: Single nucleotid polymorphisms

STAT: Transkripsiyon aktivatörü

STRP: Short tandem repeat polimorfizm

TAE: Tris-Asetik asit-EDTA

Tris: Tris (hidroksimetil) aminometan

ul: Mikrolitre

USB: Uykuda Solunum Bozuklukları

VNTR: Variable Number Tandem Repeats

TABLOLAR

Tablo 2.1. Spektrofotometrede okunan DNA değerleri

Tablo 2.2. PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları

Tablo 3.1.1. Hasta ve Kontrol gruplarında Yaş, BMI ve PSG karakteristiklerine ait değerler. Hesaplanan veriler Ortalama ± Standart Hata olarak verilmiştir. * $P < 0,05$ seviyesinde anlamlı farklılığı göstermektedir

Tablo 3.1.2. Hasta ve Kontrol grupları arasında Q ve R allel sayıları ve allel sıklıkları

Tablo 3.1.3. Hasta ve kontrol gruplarında lipid paneli ve kan basıncı arasındaki karşılaştırma değerleri. Hesaplanan veriler Ortalama ve Standart Sapma olarak verildi

Tablo 3.1.4. Hasta ve Kontrol grupları arasında birey sayıları ve genotip dağılım sıklıkları

Tablo 3.1.5. Genotip dağılımları ile Lipid paneli, kan basıncı ve SpO_2 değerleri

Tablo 3.2.1 Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta grupları ile sürekli değişkenlerin analizi

Tablo 3.2.2. Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta grupları arasındaki genotip dağılım sıklıkları.

Tablo 3.2.3. Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta ile Genotip modelleri arasındaki etkileşim değerleri. Grup: 1(Obez-Hasta), 2 (Zayıf-Hasta) ; Co-Dominant Model: AA, AB, BB, Dominant Model: AA ve AB/BB, Resesif Model (AA/AB ve BB).

Tablo 3.2.4. Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta gruplarında Q ve R allel sıklıkları

Tablo 3.3.1. Zayıf/Hasta ve Kontrol grupları ile sürekli değişkenler

Tablo 3.3.2. Zayıf/Hasta ve Kontrol grupları arasında genotip dağılım sıklıkları.

Tablo 3.3.3. Zayıf/Hasta ve Kontrol grupları ile Genotip dağılımları arasında etkileşim değerleri.

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Obstüriktif hipoapne (a), Obstüriktif apne (b), Santral apne (c), Mikst apne (d)

Şekil 1.2. LEPR OB-Rb (uzun formu) şematik görünümü

Şekil 1.3. LEPR Q223R (A→G) NCBI-SNP yerleşim haritası (rs1137101)

Şekil 2.1. Agaroz jelde yürütülen PZR ürünü örnekleri

Şekil 2.2. Q223R genotipleri

1. GİRİŞ

1.1. Uykuda Solunum Bozuklukları

Uyku sırasında solunum paterninde patolojik olarak değerlendirilebilecek düzeydeki değişikliklere bağlı olarak gelişen morbidite ve mortalitenin artmasına yol açan tablolara uykuda solunum bozuklukları (USB) denilmektedir. USB adı altında farklı klinik tablolar yer almakla birlikte, USB denince ilk akla gelen tablo " Uyku Apne Sendromu " dur. Uyku apne sendromu içinde en yaygın olan Obstrüktif Uyku Apne/Hipoapne Sendromu (Obstructive Sleep Apnes/Hypoapnes Syndrome-OSAHS) tüm olguların %90-95'ini içermektedir. (Köktürk 1998).

1.2. Uyku Apne Sendromu

Uyku apnesinin ilk tanımı 1836'da yayımlanmış *"The Posthumous Papers of the Pickwick Club"* isimli kitabında "Joe" adlı kahramanıyla Charles Dickens'a dayandırılır. Joe aşırı uyuyan, gürültülü bir şekilde horlayan ve olasılıkla sağ kalp yetmezliği olan obez bir çocuktur (Guilleminault 2004). 1956'da Burwell ve arkadaşları *Pickwick* romanında adı geçen ve sürekli uyuklayan çocuk Joe'ya itafen Pickwick sendromu sözcüğünü türettiler. 1965 yılında birbirinden bağımsız Avrupalı 2 araştırmacı uyku apnesinin Pickwick sendromu bulgularını bildirdiler (Houwelingen 1999).

Guilleminault ve ark (1973) apnenin tanımı (süresi ve tipi) ve apne indeksini (AHI-uyku saati başına düşen apne sayısı) ortaya koymuşlardır. Obez olmayan hastalarda bu sendromun ortaya çıkmasının önemini vurgulamak için daha genel anlamda 1976'da Uyku Apne Sendromu olarak ifade edilmiştir. Aynı yıl çocuklarda da bu sendromun varlığı gösterilmiştir. 1977 yılında kardiyovasküler komplikasyonlar için geri döndürülebilir bir tehlike olarak hipersomni-uyku apne sendromu tanımlanmıştır. 1983 yılında OSAHS ile ilişkili kardiak aritmiler ve iletim bozuklukları tanımlanmış, daha sonra obstrüktif uyku apnesinin sebep olduğu gece uyku bölünmeleri ve gün boyu uyuklama arasındaki ilişki gösterilmiştir. Bunları OSAHS' a bağlı kardiak aritmi, hipertansiyon, miyokardial iskemi ve infeksiyon, serebrovasküler kazalar ve ani ölümlerin incelendiği birçok çalışma takip etmiştir (Houwelingen1999).

1.2.1. Epidemiyoloji

Obstüriktif uyku apne/hipoapne sendorumu çeşitli yaş gruplarını etkileyebilir. Amerikalı yetişkinlerde OSAHS görülme sıklığı 30-60 yaş arası erkeklerde % 4 ve kadınlarda % 2 olarak rapor edilmiştir. Ancak güncel yatkınlık daha yüksek olabilir. Orta yaş yetişkinlerde erkeklerin %82 kadınların %93'üne klinik olarak tanı konulmadığı tahmin edilmektedir. OSAHS'ın maksimum sıklığı 50 ve 70 yaşlar arasında artmaktadır (Guilleminault 2004). Yaş ile OSAHS arasındaki ilişki karmaşıktır. Birkaç çalışmada orta yaşlı bireyler ile yaşlı bireyler karşılaştırıldığında yaşlı bireylerde daha yaygın olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca erkekler kadınlardan OSAHS bakımından daha yüksek bir risk taşımaktadır. Sebebi tam olarak açık değildir; fakat hormonal etkiler kısmi bir açıklama sağlayabilir. Kadınlarda menopoz sonrası hastalık riski menopoz öncesinden daha yüksek görülmektedir (Sean ve ark 2005).

Obezite, OSAHS gelişme riskini artırır ve ayrıca ırk da bir risk faktörü olabilir. OSAHS'ın sıklığı Pasifik Adalarında yaşayanlar, Meksikalı Amerikalılar ve siyahlarda daha fazladır. Siyahlar arasında OSAHS'ın yüksek olan yaygınlığı alkol ve tütüne maruz kalmadaki veya vücut kitle indeksindeki farklılıklar hesaba katılmadan 25 yaş altında kalan bireylerde daha belirgin olarak gösterilmiştir. Diğer yandan Avrupalılar ile Maori ve Pasifik adalarında yaşayanlar arasında uyku apnesinin ciddiyetinin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise boyun çevresi, vücut kitle indeksi, yaş gibi faktörler alındığında ırkın uyku apnesinin ciddiyetinde önemli olmadığı gösterilmiştir (Guilleminault 2004). Wisconsin uyku grubunun topladığı bilgiler ışığında hafif dereceli OSAHS'lı hastalarda vücut ağırlığındaki %10'luk bir artışın orta veya ciddi dereceli OSAHS gelişimini 6 kat artırdığı gösterilmiştir (Sean 2005). Hipertansiyonlu hastalarda yapılan çalışmalarla OSAHS'ın sıklığının % 26-49 oranında, oysa kontrol gruplarında % 0-12 oranında olduğu belirlenmiştir (Houwelingen 1999).

1.2.2. Etiyoloji

OSAHS çok sayıda gen içeren, çeşitli çevresel faktörler, gelişimsel faktörler tarafından etkilenen kompleks bir hastalıktır. Bu hastalık tekrar eden üst havayolu tıkanmalarına eğilim gösterir. Bu eğilim üst havayolu boyutu veya fonksiyonunu etkileyen nöromüsküler ve anatomik faktörler tarafından belirlenir. OSAHS için en güçlü risk faktörleri obezite ve erkek cinsiyetidir. Diğer risk faktörleri üst havayolunun sert ve yumuşak doku özellikleri, solunum kontrolü karakteristikleridir. Bu faktörlerin birçoğu yaş ile değişir ayrıca olası çevresel etkiler ve genler tarafından belirlenir.

OSAHS'la ilişkili birçok özelliğin ifadesi obezite, kraniofasyal yapı, santral ve çevresel sinir sistemi gelişimini etkileyebilen gelişimsel maruz kalmaya bağlı olarak etkilenebilir. Obezite, kraniofasyal yapı ve solunum kontrolü büyük ölçüde hem genetik faktörlerden etkilenir hem de OSAHS'ın ifadesini etkileyebilen alanlardır (Redline ve Tishler 2000).

1.2.3. Klinik Özellikler

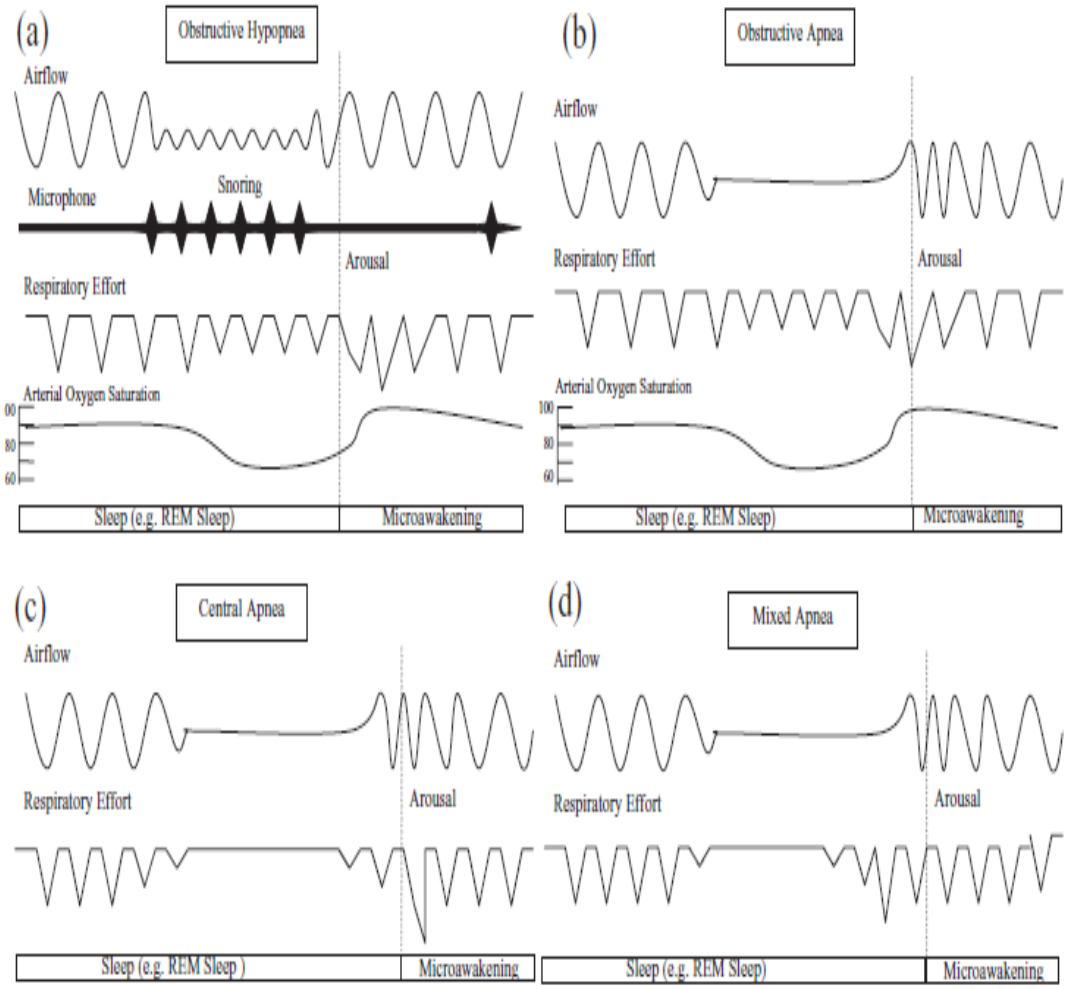
OSAHS solunum çabası devam etmesine rağmen tam (apne) veya kısmi (hipoapne) kesilme ile sonuçlanarak uyku süresince farengeal hava yolunda tekrar eden tıkanmalarla karakterizedir. Bunlar aralıklı olarak kan gazı bozulmalarına (hiperkapni ve hipoksemi) ve sempatik aktivasyonunda dalgalanmalara yol açan solunum bozulmalarıdır. 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). Bir diğer önemli semptom gün boyu aşırı uyuklamadır. Bu subjektif bir durum olduğu için belirlenmesi zordur. Klinik açıdan gün boyu uyuklamanın diğer sebepleri (metabolik) sorgulanmalıdır. Diğer olası semptomlar tıkanıklık olsun ya da olmasın kısa uyanıklıklar, gece terlemesi, uyku süresince anormal motor aktivitesi, idrar kaçırma, gastroözofagal reflü, başağrısı, göğüs ağrısı, azalmış lipido, cinsel yetersizlik, konsantrasyon ve hafıza kayıpları, kişilik değişiklikleri ve depresyon olabilir (Houwelingen 1999).

Fiziksel muayene de bazı özellikler gösterir. OSAHS'lı hastalar sıklıkla hipertansif, aşırı kilolu ve boyun çevresi 40 cm den daha fazladır. Oro-Nasal muayenesinde ise konka hipertirofisi, septal deviasyon, dar ve yüksek sert damak, düşük seviyede uzamış uvula, fazla ve düşük seviyeli yumuşak damak, tonsiller ve adenoidlerin genişlemesi ile orofarenksin daralması, dar maksilla, dar mandibula bulgularını içerebilir (Guilleminault 2004). Bu özelliklerin bir çoğu spesifik değildir ve kesin tanısı yalnız fiziksel muayene ve hasta görüşmesi ile yapılamaz. OSAHS kesin tanısı için altın standart tanı yöntemi olarak uyku laboratuarlarında kullanılan Polisomnografi (PSG) testinin yapılması gerekir (Houwelingen 1999).

1.2.4 Polisomnografi (PSG)

Kesin tanısı konulacak hastaya uyku süresince durumunu gözleyebilmek için bir gece uyku laboratuarında altın standart tanı yöntemi olan polisomnografi testi uygulanır. 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 $C4\text{-}A_1$, $C_3\text{-}A_2$, $O_2\text{-}A_1$), transkutan oksijen saturasyon probu (pulse oksimetre), horlama sensörü (mikrofon) kayıtlarını içerir (Kaparianos ve ark 2006). Ayrıca subjektif bir test olan Epworth uykululuk skalası, gündüz aşırı uyku halini ölçmek için kullanılır. 10 puan ve üzeri patolojik olarak değerlendirilir.

Uyku süresince saatteki apne/hipoapne sayısı olan apne/hipoapne indeksi (*AHI*) tanı kriteri olarak önemlidir. Obstrüktif apne, oksijen saturasyonundaki düşme ve uyanıklığa yol açan, göğüs ve karında bir çaba olmasına rağmen ağız ve burundaki hava akışının en az 10 saniye süre ile kesilmesidir. Hipoapne ise ağız ve burundaki hava akışının %50, oksijen saturasyonunun %3 lük düşmesi ya da hava akışının %30, oksijen saturasyonunun %4 azalması olarak tanımlanır (Kaparianos ve ark 2006). Bu hastalığın ağırlık derecelerine göre sınıflandırılması ise AHI <5 normal, AHI 5-15 arası hafif dereceli, 15-30 arası orta dereceli, 30 ve daha yukarısı ağır dereceli OSAHS olarak tanımlanır (Sousa ve ark 2008). Şekil 1.1' de çeşitli apne örnekleri verilmiştir.



Şekil 1.1. Obstüriktif hipoapne (a), Obstüriktif apne (b), Santral apne (c), Mikst apne (d) (Sousa ve ark 2008)

1.3. Mutasyon ve Polimorfizm

Organizmada gelişimsel planı belirleyen ve tüm hücresel aktivitelerin yönetiminden sorumlu olan molekül DNA'dır. DNA dizilerindeki değişiklikler bireylerin birbirinden farklı olmasına yol açar (genetik çeşitlilik). Genom, protein kodlayacak olan genler ve çok miktarda kodlamayan dizilerinden oluşur. Genlerin içinde de ekzon ve intron dediğimiz iki farklı kısım vardır. Bunlardan ekzonlar protein yapımına katılırken protein kodlamayan ve genomun %25'ini oluşturan intronlar RNA işlenirken kesilerek uzaklaştırılırlar. Diğer yandan genomun %60'ından fazlasını, çeşitli tipte tekrarlayan DNA dizileri, psödogenler, genler arasındaki tekrarlanmayan aralayıcı diziler ve mRNA'ların 5' ve 3' uçlarında bulunan, proteine çevrilmeyen diziler oluşturur (Cooper 2006). Böylece genetik çeşitliliğe yol açtığını var saydığımız değişikliklerin DNA'nın hangi kısmında olduğu önem kazanır.

Protein kodlayan ve oluşan proteinin işlevini önemli ölçüde sınırlayan DNA değişiklikleri mutasyon olarak adlandırılır ve hastalığa yol açarlar. Proteinlerde farklılık yaratmayan, ya da oluşan farklılıkların fenotipte değişikliğe yol açmadığı, DNA dizi değişiklikleri ise 'normal varyasyonlar' ya da polimorfizm kavramı altında ele alınırlar. Evrim boyunca seçici baskı altında olan mutasyonların toplumda nadir gözlenen değişiklikler olmasına karşın polimorfizmler toplumda yaygın olarak bulunurlar (%1'in üzerinde). Oluş mekanizmalarına ve bulundukları yere göre farklı tipte polimorfizmler mevcuttur.

1.3.1. Kısa DNA Baz Tekrarları (Short Tandem Repeat Polimorfizm; STRP veya microsatellite)

İnsan genom çalışmaları sırasında genomda şifreye dönüşmeyen bölgelerde iki baz (örneğin sitozin-adenin; CACACACA….gibi) ya da dört bazlık (Guanin-Adenin-Timin-Adenin; GATAGATAGATA….gibi) tekrar bölgeleri olduğu görülmüştür. Bunların şu andaki bilgilerimize göre işlevsel herhangi bir görevleri yoktur; ancak bireylerin DNA'larının birbirinden farklı olmalarına neden olurlar ve toplumda yaygın bulunurlar. Bu bölgeler içerdikleri tekrar sayılarına göre DNA'da bölgeye özgü bireysel büyüklük farkları yaratırlar.

Homolog kromozomlardan birisi babadan diğeri anneden gelmiş olduğu için ilgilendiğimiz tekrar bölgesi açısından bireyin iki kromozomu arasında fark olabilir. Böyle bir bireyin DNA'sının ilgili bölgesini Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) metodu ile çoğaltıp jelde yüksek elektrik akımı altında yürütecek olursak, daha kısa olan DNA parçası daha hızlı ilerleyecek diğeri ise geride kalacaktır. Böylelikle jel üzerinde farklı bant görünümleri oluşacaktır. İncelenen bireylere ait DNA'lar çoğaltılıp jelde yan yana yürütülecek ve jel görüntüleri karşılaştırılacak olursa bireysel DNA farklılıkları saptanabilir ve genetik gösterge olarak kullanılabilir. İnsan genom projesi kapsamında genomda böyle özelliğe sahip bölgeler saptanarak bu bölgelerin PZR metodu ile çoğaltılmasına olanak verecek, bölgeye özgü nükleotid dizileri (Primer) ve bunların kromozom bölgelerine göre yerleri bilinmektedir. Gen haritalama çalışmalarında kullandığımız genetik göstergeler bu bölgelerin çoğaltılmasıyla oluşmaktadır ve gen haritalama çalışmalarında kullanım kolaylığı sağlamaktadır (Akarsu 2004).

1.3.2. Uzun DNA Baz Tekrarları (Variable Number Tandem Repeats; VNTR; minisatellitler)

DNA'nın bazı bölgelerinde blok halinde büyük DNA parçalarının (9-70 baz çifti ve daha uzun bölgeler) tekrarlandığı görülür. Bu tekrar bölgelerini içeren DNA parçaları bölgeyi içine alacak şekilde bölgenin dışından enzimler aracılığı ile (Restriksiyon enzimleri) kesilir. Daha sonra ilgili bölge nitroselülöz bir membrana aktarılır ve VNTR bölgelerine özgü işaretli DNA parçaları ile (probe) birleştirilir (Southern blotting yöntemi). Böylelikle bireyler arasında farklı uzunlukta olan DNA parçaları görünür hale getirilmiş olur. VNTR'lerin saptanması özellikle adli tıpta genetik parmak izi (genetic fingerprinting) dediğimiz işlemde geniş kullanım alanı bulmuştur (Brock 1993).

1.3.3. DNA'nın Tek Bir Bazındaki Değişiklikler (Single Nucleotid Polymorphisms; SNP)

Burada tek bir DNA bazında (Örneğin Adenin) başka bir baza değişme (Örneğin Guanin) söz konusudur. Bu değişiklik genomun şifreye dönüşmeyen kısımlarında meydana geldiği zaman yorumlanmaları tıpkı yukarıda anlatılan kısa ve uzun baz tekrarlarındaki farklılıklar gibidir, bireyler arasında genetik çeşitliliğe yol açarlar. Genetik materyaldeki normal varyasyonlar bazen gen içinde hatta ekzonlar içinde de olabilir.

Proteinlerin yapısına katılan amino asitler 3'lü DNA baz dizileri ile kodlanırlar. Örneğin GTT dizisi Valin amino asidini kodlar. Bu üçlü yapının ilk iki bazındaki değişiklikler amino asit yapısında değişikliğe yol açarken son bazdaki değişiklik (GTC; GTA; GTG gibi) yine valin amino asidini tanıyarak, sonuçta oluşan amino asit şifresinde bir farklılık yaratmaz. Bu tip değişiklikler gen içinde oldukları halde proteinde değişiklik yapmadıkları için "eşanlamlı" (synonymous) mutasyonlar olarak adlandırılırlar. Bazı durumlarda da oluşan DNA değişikliği amino asidi değiştirir ancak bu değişiklik proteinin fonksiyonunda etkili olmaz. Bu tip değişiklikler de "sessiz mutasyonlar" ya da eş anlamlı olmayan (nonsnonymous) değişiklikler olarak adlandırılır. Bütün bu değişiklikler polimorfizim kapsamı içinde ele alınır, toplumda yaygın olarak bulunurlar ve bireylerin genetik materyalini birbirinden farklılaştırarak genetik gösterge olarak kullanılabilirler. SNP değişikliklerinin son yıllarda fark edilen önemli bir yararı da bu değişikliklerin gen içinde yer alanların gen haritalama çalışmalarında hastalığın doğrudan çalışılan gene bağlantı gösterip göstermediğinin saptanabilmesine yardımcı olmasıdır. SNP'ler bugün özellikle DNA çip teknolojisinin gelişmesi ile ilgili hastalıklara genetik yatkınlıkların sınandığı en önemli göstergeler haline gelmişlerdir (Akarsu 1999).

SNP değişiklikleri ile çalışmak, DNA parçacığında büyüklük farkı yaratan diğer polimorfizmlerle (örneğin STRP) çalışmaktan farklıdır. Burada tek bir baz başka bir baza değişmektedir ve büyüklük farkı oluşmadığı için bu bölgeleri PCR metodu ile çoğaltıp jelde oluşturacağı büyüklük farkları açısından değerlendirmenin bir anlamı yoktur.

Alellerden birinde oluşan bu baz değişikliğini tanıyacak ve çoğaltma sonrasında iki allel arasında büyüklük farkı yaratacak farklı primer kullanılmasına dayalı "allele özel amplifikasyon" bu amaçla kullanılan yöntemlerden biridir.

Oluşan değişiklik belli DNA bölgelerini tanıyıp kesen enzim bölgelerinde oluşmuşsa, ilgili enzimin DNA'yı kesip kesmemesini denemeye dayalı DNA'yı kesen enzimlerin oluşturduğu uzunluk polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) de kullanılabilir. Yine bu değişimi florasan işaretlerle tanıyan otomatik analizatörlerin bu amaçla kullanılması da pahalı fakat etkin yöntemlerdir (Akarsu 2004).

1.3.4. DNA'yı Kesen Enzimlerin Oluşturduğu Uzunluk Polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)

DNA'yı belli baz dizilerinden tanıyıp kesen enzimler DNA kesim enzimleri (Restriction Endonucleases) olarak isimlendirilirler. Bazı kesim enzimlerinin özgül tanıma bölgeleri genellikle 4-6 DNA bazından oluşur. Normalde enzimin tanıma bölgesi olan bu bazlarda bir değişiklik olduğunu var saydığımızda enzimin DNA'yı kesme kalıbı değişecektir. Yani genomik DNA'da oluşan dizi değişiklikleri, belirli kesim bölgeleri yaratır veya olanları yok eder. Bu nedenden dolayı boyutları değişen bir veya birden fazla DNA fragmenti, Southern blot ve klonlanmış DNA probu ile hibridizasyondan sonra görünür hale getirilebilir. Bu enzim kesim özellikleri polimorfik nitelikteki genetik göstergelerin bir diğer örneği olarak kabul edilebilir (Dib ve ark 1996). Görülüyor ki altta yatan moleküller değişiklik ne olursa olsun polimorfizm dediğimiz zaman genetik materyalde bireyleri (hatta aynı bireyin farklı allellerini) birbirinden farklılaştıran ve toplumda yaygın olarak bulunan değişikliklerden söz edilmektedir.

1.4. Obezite, Leptin ve Leptin Reseptörü

1.4.1 Obezite

Obezite OSAHS için en büyük risk faktörlerinden birisidir (Redline ve Tishler 2000). Vücut kitle indeksi (Body Mass Index: BMI) vücut ağırlığının (kg) boy uzunluğunun (m) karesine bölünmesi ile elde edilir ve obez ve obez olmayan bireyleri ayırmada yaygın olarak kullanılır. BMI, 25,0-29,9 arası olanlar aşırı kilolu 30,0 ve daha yukarı olanlar obez olarak tanımlanmıştır (Marik 2000).

Obezitenin, orta yaşlı erkeklerde gözlenen birçok belirli etki ile OSAHS riskini 10-14 kat artırdığı gözlenmiştir. Obezite göğüs duvarındaki kompliansı azaltması ile ilişkili hipoventilasyonun ortaya çıkması ve/veya azalan nazofarengeal çap, üst havayolu dokularında yağ birikmesi OSAHS' a olan yatkınlığı artırabilir (Redline ve Tishler 2000). Aşırı vücut yağı, özellikle ekspirator rezerv hacminde azalma ve FEV_1/FVC oranında artma şeklinde solunum sisteminde birkaç etkiye sahiptir. Vital kapasite, total akciğer kapasitesi, fonksiyonel rezidüel hacim genel olarak orta derecede obez olan normal bireylerde korunurken morbid obez bireylerde %30 ve daha fazla azalır. Solunumun günlük yüksek olan karbondioksit üretimini azaltması kadar anormal göğüs elastikiyeti, göğüs duvarı direnci, hava yolu direnci, anormal diyafragmatik pozisyon ve üst hava yolu direncide artmaktadır. Ciddi obez hastalar ventilasyon-perfüzyon uyumsuzluğuna sebep olan genişlemiş alveolar-arteriel oksijen değişimi ile sık sık hipoksemiktir. Dahası obezite pulmoner tromboembolizim için büyük bir risktir. Obezitenin etyolojisi uzun bir peryod boyunca pozitif bir enerji dengesine sebep olacak potansiyele sahip birkaç faktör ile birlikte heterojen bir durum oluşturmaktadır. Bu faktörler yüksek bir yağ diyeti, alışılmış düşük seviyeli bir fiziksel aktivite, belirli bir vücut kitlesi ve kompozisyonu için düşük bir dinlenme metabolik hızı, açlık durumunda (standart koşullar altında lipidlerden daha çok karbonhidrat oksidasyonuna eğilim gibi) daha yüksek bir solunum oranı, muhtemelen yüksek insülin duyarlılığını içerebilir. Birçok obez bireyde dolaşımdaki yüksek leptin seviyeleri bir leptin direnci göstergesi olabilir. (Marik 2000).

1.4.2. Leptin

Zhang ve ark tarafından 1994 yılında keşfedilen *leptin*, sitokinlere benzeyen ve 167 amino asit içeren protein yapısında bir hormondur. İnsanda 7. kromozomun uzun kolunda bulunan (7q31) ob/ob geninde kodlanmıştır. 3 exon ve 2 introndan oluşur. Vücütta başlıca adipoz (yağ) dokuda sentezlenen leptinin az miktarda plasenta, gastrik epitelyum, iskelet kası, hipofiz ve meme bezi tarafından da salgılandığı gösterilmiştir. Kanda iki formda bulunur; serbest ve proteine bağlı. Leptinin aktivitesinden serbest formunun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda obez bireylerde serumdaki leptinin büyük kısmının serbest formda olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda obez kişilerde serbest leptin formunun artışının tespit edilmesi, obezite gelişiminde asıl sorunun leptin eksikliği değil, leptin direnci olduğu hipotezini destekleyen kanıtlardan biri olarak görülmektedir (Aslan ve ark 2004). Örneğin çoğunlukla tip II diyabette olduğu gibi reseptör ve intraselüler sinyal bozuklukları obez bireylerde leptin direncinden sorumlu olabilir. Leptin enerji alımı veya harcanmasını, nöroendokrin fonksiyonu düzenleyen birkaç nörepeptidin ifadesini değiştirmek için hipotalamustaki spesifik reseptörlere bağlanarak çalışır. Leptin iştahın güçlü bir stimülatörü olan hipotalamik nöropeptid Y (NPY)'nin sentezini engeller. Dahası NPY'nin azaltılması enerji harcanması ve sempatik sinir sistemi çıkış akımının artmasıyla sonuçlanır. Leptin direkt olarak lipid oksidasyonunu arttırması ile birlikte yağ asidi ve trigiliserit sentezini azaltarak intraselüler lipid artışını engeller. Lipid metabolizmasına etkisi, yağ asiti sentezinde enzim hızını sınırlayarak, asetil CoA karboksilaz aktivitesini engelleyen bir etki olabilir (Marik 2000).

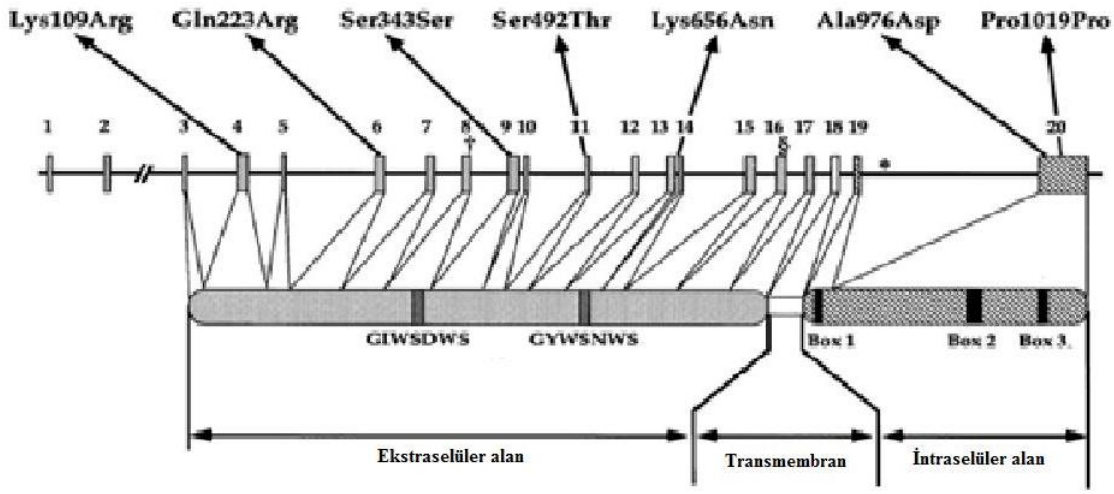
.

1.4.3. Leptin Reseptörü (LEPR)

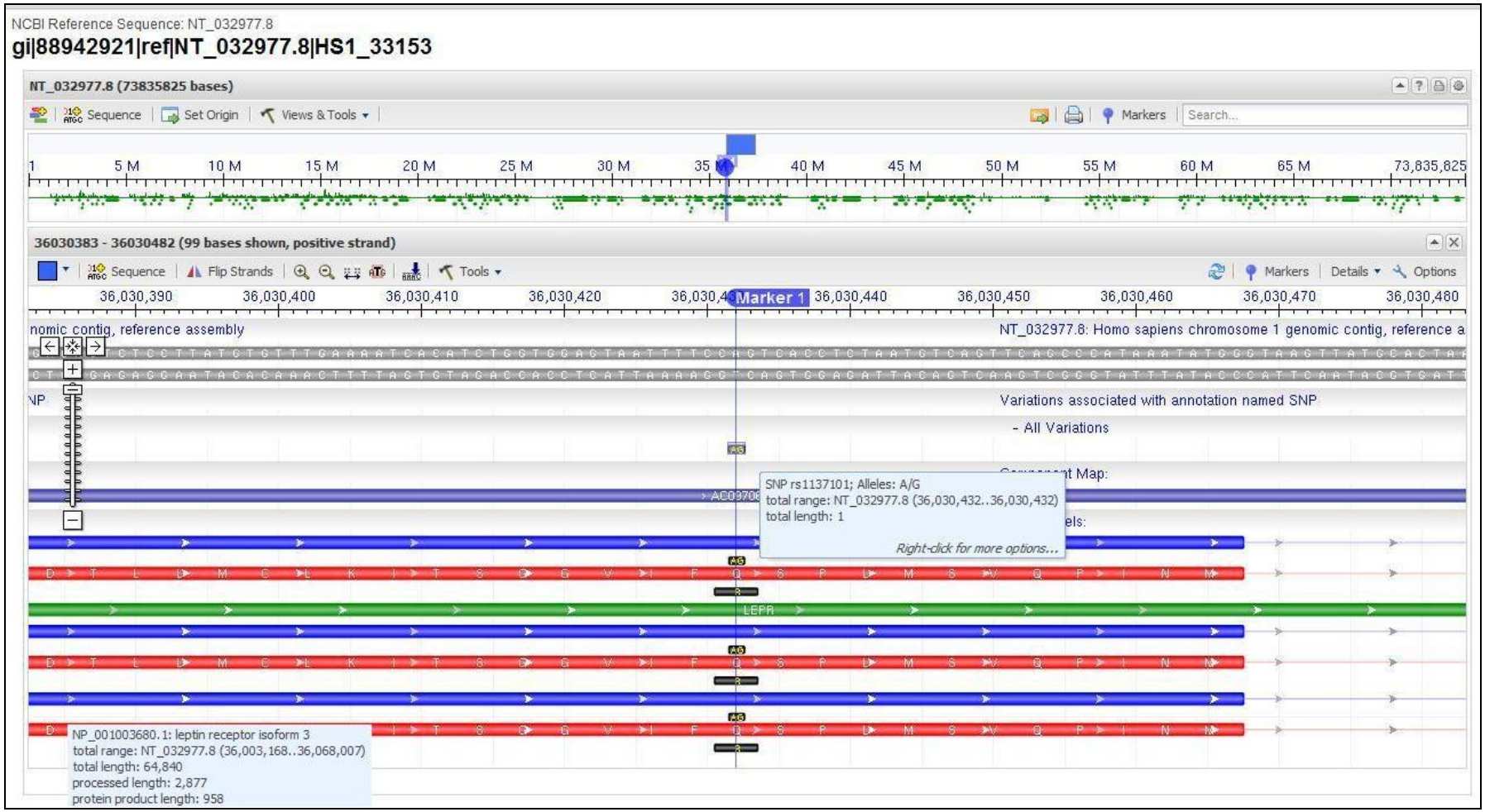
Leptin reseptörü, sitozolik transkripsiyon aktivatörü (STAT) proteinlerinin aktivasyonu yoluyla gen transkripsiyonunu uyardığı bilinen gp130 sitokin reseptör ailesinin bir üyesidir (OMIM 2009). Leptin reseptörü OB-Rb (uzun reseptör) ve OB-Ra (kısa reseptör) olarak 2 alternatif kırpılma (splicing) izoformuna sahiptir (Yiannakouris ve ark 2001). Biyolojik olarak aktif olanlardan birisi Ob-Rb izoformu sinyal transdüksiyonu kapasitesine sahiptir ve hipotalamusta (nükleus arkuatus) bol olarak ifade edilir. OB-Ra ise intraselüler sinyal için gerekli olan segmentlerin tümünü taşımazlar ve bu nedenle sinyal iletiminde rolleri çok az veya yoktur. OB-Ra reseptörlerinin bulunduğu başlıca dokular böbrek, akciğer, pleksus koroideus ve beyin kapillarlarıdır. Son ikisinde OB-Ra reseptörlerin bol bulunması bunların leptinin merkezi sinir sistemine transportunda önemli görevleri olduğunu düşündürmektedir (Aslan 2004).

Leptin reseptör geninin OB-Rb formu 70 kb' dır ve 20 exon içerir. LEPR reseptörü protein yapısına göre ekstraselüler, transmembran ve intraselüler bölgelerden oluşur. LEPR geninde birkaç fonksiyonel önemli domain vardır. Ekstraselüler bölgede ligand bağlanmasını sağlayan iki sitokin motifi (GXWSXWS) içerir. İntraselüler bölge hipotalamusta STAT ve Janus-aktive kinazla (JAK) etkileşen diziler bulundurur (Matsuoka 1997, Yong-Jun ve ark 2004).

Şekil 1.2’ de görüldüğü gibi OB-Rb gen yapısında 7 dizi varyantı bulunur. Bu tek nükleotid polimorfizmleri; ekzon 4’de 329. nükleotid de A→G (Lys109Arg), ekzon 6’da 668. nükleotid de A→G (Gln223Arg=Q223R, Şekil 1.3) , ekzon 9’da 1029. nükleotid de T→C (Ser343Ser), ekzon 11’de 1475. nüklotid de G→C (Ser492Thr), ekzon 14’de 1968. nükleotid de G→C (Lys656Asn), ekzon 20’de C→A (Ala976Asp), G→A (Pro1019Pro) transisyon ve transversiyonları görülür (Matsuoka 1997, Thompson 1997). Şekil 1.3’ te çalışmamızda inceleyeceğimiz Q223R polimorfizminin gen haritasında yerleşimi verilmiştir.



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



Şekil 1.3. LEPR Q223R (A→G) NCBI-SNP yerleşim haritası (rs1137101)

1.5. Amaç

OSAHS solunum çabası devam etmesine rağmen tam (apne) veya kısmi (hipoapne) kesilme ile sonuçlanarak uyku süresince farengeal hava yolunda tekrar eden tıkanmalarla karakterizedir. Obezite ve erkek cinsiyeti, OSAHS için belirlenmiş en yaygın risk faktörleridir (Renata L. Riha). Uyku düzensizliği şikâyeti olmayanların %40'ı, bariatrik cerrahi altındaki bütün adolesanların % 55'i ve morbid obezlerin %71'inden fazlası OSAHS göstermektedir (Sousa ve ark 2008). Leptin adipositlerde üretilen bir hormondur ve hipotalamusta spesifik reseptörüne bağlanarak iştahın azaltılması ve enerji tüketiminin artırılmasından sorumludur. Hem hayvan hemde insan çalışmaları, Leptin ve LEPR'nin obezite mekanizmasında önemli rolü olduğunu göstermiştir. Leptin sinyal kaybı insanda ciddi obeziteye sebep olmaktadır ve dolaşımdaki leptin konsantrasyonu body mass index (BMI-Vücut Kitle İndeksi) ile güçlü ve pozitif bir ilişkiye sahiptir (Hanaoka ve ark 2008).

Şimdiye kadar yapılan çalışmaların çoğunluğu obezite ile LEPR Q223R polimorfizmi arasındadır. OSAHS ve LEPR Q223R polimorfizmi arasında çok fazla çalışma bulunmamaktadır.

Japon popülasyonunda 130 OSAHS'lı hasta ve 50 sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılarak yapılan bir çalışmada Leptin genindeki tetranükleotid tekrar polimorfizmleri ve Lys109Arg, Gln223Arg, Lys656Asn tek nükleotid polimorfizmleri ile OSAHS arasında bir ilişki bulunmamıştır. (Hanaoka ve ark 2008).

Popko ve ark (2007) leptin reseptöründeki Gln223Arg polimorfizmini 102 OSAHS'lı hasta ve apnesi olmayan 77 kontrol ile karşılaştırmışlar; Arg alleli mevcudiyetinin OSAHS'lı hastalarda yüksek lipit seviyeleri ve obezite ile yüksek risk bağlantısı olduğunu göstermişlerdir. OSAHS'ın leptin reseptörünü de kapsayan genlerin çeşitliliğinden etkilendiği ve güçlü bir genetik temele sahip olabileceği vurgulanmıştır.

Çin kuzey bölgesi "Han" popülâsyonunda 103 OSAHS'lı hasta ve 78 OSAHS olmayan bireyin katıldığı çalışmada iki grup arasında Gln223Arg polimorfizmi açısından farklılık bulunmamıştır. GG genotipli OSAHS'lı hastalar ile GA+AA genotipli hastalar arasında boyun çevresi hariç BMI, trigliserit, kolesterol, insülin, leptin, bel-kalça oranı, kan basıncı, tokluk kan şekeri bakımından anlamlılık tespit edilmemiştir (Huang ve ark 2003).

Ben Ali ve ark (2009) Tunus popülasyonunda yaptıkları çalışmada obez bireyler arasında dolaşımdaki Leptin seviyeleri ve LEPR Q223R polimorfizminin BMI ve leptin seviyelerini etkilediğini göstermişlerdir. Duarte ve ark (2007) genetik geçmişi ve orijini farklı 200 obez ve 150 zayıf sağlıklı Brezilyalı bireylerde body mass index (BMI) ile adrenerjik reseptör (β3-AR) p.W64R, Leptin c.-2548G>A ve LEPR p.Q223R gen varyantları arasındaki ilişkiyi incelemişler, zayıf ve obez bireylerde (β3-AR) p.W64R ve Leptin c.-2548G>A polimorfizimlerinin genotip sıklığında anlamlı bir farklılık bulamamışlardır. Ancak LEPR p.Q223R varyantında normal ve obez gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit etmişlerdir. Sonuç olarak leptin reseptöründeki genetik değişkenliğin vücut ağırlığının düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Duarte ve ark (2006) Brezilya popülasyonunda obez fenotipinde bulunan LEPR Q223R gene polimorfizminin rolünü belirlemek için obez ve obez olmayan bireylerde yaptıkları çalışmada bu polimorfizmin obezite ile güçlü bir ilişkisinin olduğunu bulmuşlardır. Guizar-Mendoza ve ark (2005) yaptığı çalışmada Meksikalı adolesanlarda ki LEPR geni Gln223Arg polimorfizminin hemodinamik ve obezite ile alakalı metabolik bozukluklar ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. İnsan LEPR geninin yaygın birkaç polimorfizmi ve nadir varyantları, geniş olarak popülasyon tabanlı ilişki yaklaşımı kullanılarak, bunların obezite ile potansiyel ilişkisi farklı popülasyonlarda değerlendirilmiştir. Örneğin, obezite fenotipleri ve Gln223Arg (Q223R) polimorfizmi arasındaki ilişki, Amerikalı beyazlar, Pima yerlileri (güney Arizona-ABD ve kuzey Meksika arasındaki yerliler), siyahlar ve Japonlar hariç orta yaşlı beyaz erkekler, post menopozal beyaz kadınlar, Akdenizli bir popülasyon ve genç Hollandalı yetişkinlerde gözlenmiştir.

Ayrıca LEPR gen lokusu ve adipozite (yağlanma) arasındaki bağlantı Fransız beyazlarda gözlenmesine rağmen bu bağlantı Pima yerlileri ve Meksikalı Amerikalılarda gözlenmemiştir. (Liu ve ark 2004). Gotoda ve ark. (1997) 190 obez (BMI >28kg/m²) ve 132 zayıf (BMI <22 kg/m²) beyaz İngiliz erkekleri ile yaptıkları çalışmada leptin reseptör genindeki mutasyonların insan obezitesinin ortak bir sebebi olmadığını göstermişlerdir. Matsuoka ve ark. (1997) leptin reseptör genindeki mutasyonların insanda obeziteye sebep olup olmadığını açıklamak için obez Japon bireylerde Ob-Rb (leptin reseptörü uzun izoformu) genindeki mutasyonları taramışlardır. Obez ve obez olmayan bireyler arasında Ob-Rb genindeki 7 dizi varyantının (Lys109Arg, Gln223Arg, Ser343Ser, Ser492Thr, Lys656Asn, Ala976Asp, ve Pro1019Pro) her birinin allel sıklıklarında anlamlı bir farklılık bulamamışlardır. Çalışma sonunda Ob-Rb kodlanan bölgedeki dizi varyantlarının obezite ile ilişkili olmadığını ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmada Leptin reseptöründeki Q223R polimorfizmi ile OSAHS arasındaki ilişkinin moleküler düzeyde mutasyon tarama yöntemlerinden biri olan PZR-RFLP yöntemi kullanılarak Konya popülasyonunda çalışılması planlanmıştır. LEPR Q223R polimorfizminin genotiplerinin sıklığını saptamak için hasta bireyler ve kontrol bireyleri olarak 2 grup oluşturulmuş, genotiplerin obeziteye etkisini gösterebilmek için hasta grubu BMI indeksine göre obez/hasta (BMI >30) ve zayıf/hasta (BMI <27) alt gruplarına ayrılmıştır. Bu genotiplerin OSAHS'a etkisini görebilmek için zayıf/hasta grubu kontrol ile karşılaştırılmıştır. R allelinin etkisi dominant (QQ ve QR/RR) ve resesif (QQ/QR ve RR) modeller ile gruplar arasında belirlenmeye çalışılmıştır. Gruplar ve genotip modelleri ayrı ayrı değerlendirilerek diğer değişkenler (Yaş, BMI, AHI, Boyun çevresi, Bel çevresi, Kolesterol, Trigliserit, HDL, LDL, Kan basıncı, Oksijen saturasyonu-%-, Epworth uykululuk skalası) arasında ki ilişki çeşitli istatiksel yöntemler kullanılarak açıklanmaya çalışılmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Hasta Kabulü

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıları Uyku Laboratuarına 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 poliklinikte uzman doktor tarafından muayene edilerek, boyun ile bel çevresi ve kan basınçları ölçüldü. Gerekli görülenlere resmi prosedür gereği hasta yatışı yapıldı ve rutin biyokimyasal parametreler (hemogram, glikoz, kolesterol, trigliserit, HDL, LDL… gibi) ve diğer tahlilleri (EKG, solunum fonksiyon testi, iki yönlü akciğer grafisi) yaptırmaları için yönlendirildi. Yatışı yapılan hastalar akşam saat 9.00'da PSG testi için uzman uyku teknisyenleri tarafından 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. Kontrol grubu ise hastane personeli ve yakın çevreden gönüllü olarak çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerden oluşturuldu. 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. Hasta grubu BMI indeksine göre Obez/Hasta (1) ve Obez olmayan/Hasta (2) olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı. 1. Grup için 43, 2. Grup için 45 ve kontrol grubu için 32 birey çalışıldı.

2.3. 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.

2.4. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için klasik yöntem olarak Fenol: Kloroform: İzoamilalkol içeren bir prosedür 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^{0}C 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.

Sulandırılan stok DNA'lar -20^{0}C'de saklandı. DNA' ların kalitesi ve miktarını ölçmek için S.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Genetik Laboratuarına ait spektrofotometrik ölçüm yapabilen nanodrop cihazı kullanıldı. Kontaminasyonu önlemek için 0,5 ml stok DNA' dan 0,1 ml' lik 50-100 ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde çalışma stoğu hazırlandı ve tekrar nanodrop cihazında ölçüm yapıldı (Tablo 2.1).

260 nm OD (optik dansite) ölçümünün 280 nm OD ölçümüne oranı bize DNA'mızda protein ya da RNA kontaminasyonu olup olmadığı hakkında bilgi verir. A_{260}/A_{280} oranının 1,8 ile 2,0 arasında olması beklenir. OD'nin 2,0'nin üzerinde olması protein kontaminasyonuna, 1,8'in altında olması da RNA kontaminasyonuna işaret eder (Leland 2004). Bu durumda DNA'ların temizlenmesi gerekmektedir. Ancak örneklerimizin temizlenmesine gerek kalmamıştır. Tablo 2.1' de bazı örneklerimize ait DNA değerleri görülmektedir.

Tablo 2.1. Spektrofotometrede okunan DNA değerleri

DNA Örnek No	**Oran A_{260}/A_{280}**	**Stok DNA 0,5 ml (ng/ml)**	**Sulandırılmış 0,1ml (ng/ml)**
5	1,75	531,8	68,8
7	1,85	423,1	79,4
15	1,82	1012,1	176,1
25	1,75	407,7	94,5
38	1,80	446,8	51,3
46	1,65	469,3	82,6

2.4.1. İzolasyonda kullanılan çözeltiler

10x Lysis Buffer

770 mM NH_4Cl

46 mM $KHCO_3$

10 mM EDTA

10X Lysis Buffer hazırlanışı:

Mezür içerisine yukarıdaki konsantrasyonlarda miktarlar tartılarak konur. Önce 200–300 ml dH_20 içerisinde çözülür. EDTA' nın çözülmesi için pH=8 yapılır. Daha sonra 1 litreye tamamlanır.

Salt Edta

75 mM NaCl

25 mM EDTA

Salt EDTA hazırlanışı: Mezür içerisine yukarıdaki konsantrasyonlarda miktarlar tartılarak konur. 200-300 ml dH_2O içerisinde çözülür. EDTA' nın çözülmesi için pH=8 yapılır. Daha sonra 1 litreye tamamlanır.

%10 SDS solüsyonu;

SDS	10 gr
dH_2O	100ml

Hazırlanışı: 10 gr SDS tartılır, 100 ml' ye tamamlanır. Çözülmesi için 68 ^{0}C de sıcak su banyosunda bekletilir.

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

50 ml Tris için 0,060 gr tartılır ve 50 ml ye tamamlanır.

Sodyum Asetat Çözeltisi: (NaAc MA: 136)

500 ml 3M NaAc çözeltisi için 204 gr tartılır ve dH_2O ile 500 ml' ye tamamlanır. HCl ile pH= 5,2 'ye ayarlanır. +4 ^{0}C' de muhafaza edilir.

2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Genomik DNA'dan istenilen gen bölgesini çoğaltmak için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapıldı. Guizar-Mendoza ve ark'ın (2005) çalışmalarında kullandığı LEPR Q223R polimorfizmine (rs1137101) ait primer çifti seçildi. Primerler Metabion (Almanya) firmasına sentezlettirildi.

İleri primer (Forward) 5'-ACC CTT TAA GCT GGG TGT CCC AAA TAG-3' Tm: 68 ^{0}C

Geri primer (Reverse) 5'-AGC TAG CAA ATA TTT TTG TAA GCA ATT-3' Tm: 59 ^{0}C

PZR, her bir örnek için tablo 2.2' de miktarları ve konsantrasyonları verilen 20 ul reaksiyon hacminde ve reaksiyon koşullarında çalışıldı. PZR sonrası 416 bp (base pair)' lik PZR ürünü oluşturuldu. PZR çalışması için peQLab-primus 96 advanced marka cihaz kullanıldı.

Tablo 2.2. PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları

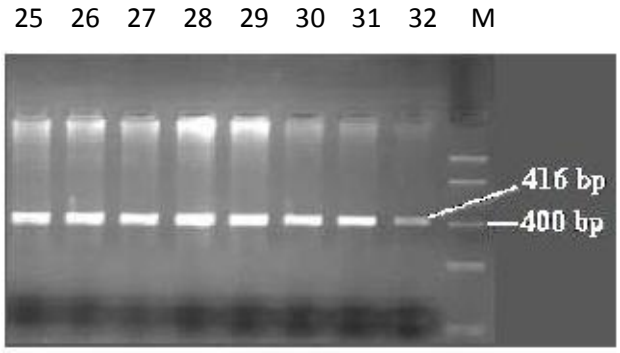
Bileşen	Miktar	Konsantrasyon		1. basamak	2. basamak	3. basamak
ddH2O	13,22 ul			Denatürasyon 94 ^{o}C 8 dk.	Denatürasyon 94 ^{0}C 45sn	Final extension 72C 10dk
Buffer	2,5 ul	1X				
dNTP	1,6 ul	10mM				
Fw	0,14 ul	50 pmol/ul			Annealing 60 ^{0}C 45sn	
Rw	0,14 ul	50 pmol/ul				
Taq Poly.	0,4 ul	2,5 U/ul				
DNA	2 ul	50-100 ng/ml			Extension 72 ^{0}C 90sn	
Total	20 ul					

2.5.1. 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 (loading dye) karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 45 W akımla 20 dakika yatay elektroforezde yürütüldü. Daha sonra jel ultraviyole transsimülatör de 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. Agaroz jelde yürütülen PZR ürünü örnekleri

2.6. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Uygun şekilde çoğaltılan PZR ürünleri genotipleme için polimorfik bölgeye uygun restriksiyon endonükleaz ile kesildi. Bu aşama da 5'-C^CGG-3' tanıma bölgesine sahip MspI enzimi (Sibnezyme) kullanıldı.

Normal dizi → 5'-…..ATTTTCCAGTCACCT…..-3'

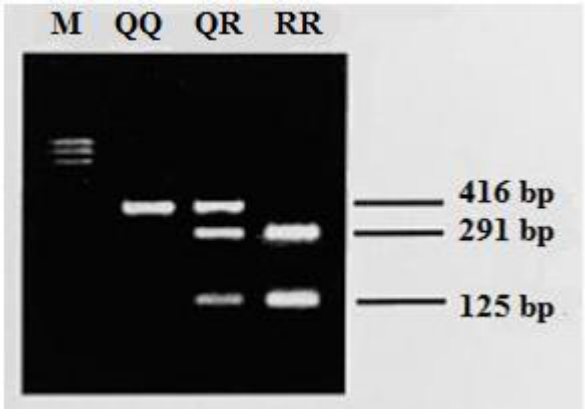
Mutant dizi → 5'-.....ATTTTC|CGGTCACCT……-3'

MspI ^tanıma bölgesi

Her bir reaksiyon için tüplere toplam 20 ul' lik hacimde olacak şekilde 10 ul PCR ürünü, 1 ul restriksiyon enzimi (10 U/ul), 1 ul 10x enzim buffer ve 8 ul dH_2O konuldu. Enzim aktivitesi için 37 ^{0}C'de 1 gece boyunca etüvde bekletildi.

2.6.1. Agaroz Jelde Görüntüleme

Jel görüntüsü için %2' lik agaroz hazırlandı. Enzim aktivitesini sonlandırmak ve yükleme yapabilmek için 3 ul yükleme tamponu ve 10 ul RFLP ürünü karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. 45W akımla 22 dakika yürütüldü. Sonuçları değerlendirmek için UV transsimülatörde jel fotoğraflandı. Şekil 2.2' de görüldüğü gibi bu bölgede 3 farklı polimorfik allel oluştu.



Şekil 2.2. Q223R genotipleri

2.7. İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler ticari bir istatistik programı ile yapıldı. Analizlerde ölçümsel verilerin karşılaştırılmasında ikili gruplar için student t testi, üç ve daha fazla olan gruplar için Anova, etkileşimlerini karşılaştırmak için General Linear Model (GLM) ve niteliksel veriler için non-parametrik testlerden Ki-kare testi ve Fisher's exact testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan ölçümsel verilere logaritmik dönüşüm (Log10) uygulandı. Sonuçlar istatistiksel olarak $P<0,05$ düzeyinde anlamlı kabul edildi.

2.8. Etik Kurul Onayı

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan "Konya Popülasyonunda İnsan Leptin Reseptör Genindeki Gln223Arg Polimorfizmi ile OSAHS arasında ilişki analizi" başlıklı bu çalışma 22.02.08 tarihli ve 2008/021 karar sayısı ile etik kurul onayı almıştır.

3. BULGULAR

OSAHS' lı 88 hasta ve 32 sağlıklı kontrole 1 gece boyunca PSG yapıldı. Bütün hasta ve kontrol grupları önce yaş, BMI, AHI, boyun ve bel çevresi, SpO_2 ve Epworth uykululuk skalası değerleri ile karşılaştırıldı. Daha sonra hasta ve kontrol grupları lipid paneli ve kan basıncı değerleri ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında genotip dağılımı ve allel sıklıkları değerlendirildi. Oluşturulan obez/hasta ve zayıf/hasta grupları ile zayıf/hasta ve kontrol grupları ayrı ayrı benzer açılardan değerlendirildi. Anlamlı çıkan veriler, çalışma grupları ve genotip dağılımlarının sürekli değişkenlere göre etkileşimine bakıldı.

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

Hasta ve Kontrol gruplarının Yaş, BMI ve PSG karakteristikleri Tablo 3.1.1'de karşılaştırıldı ve SpO_2 değerine Logaritmik dönüşüm uygulandı. Hasta ve Kontrol grupları arasında Q ve R allel sayıları ve allel sıklıkları Tablo 3.1.2'de, Hasta ve kontrol grupları ile lipid paneli ve kan basıncı arasındaki karşılaştırma değerleri Tablo 3.1.3'de gösterildi.

Tablo 3.1.1. Hasta ve Kontrol gruplarında Yaş, BMI ve PSG karakteristiklerine ait değerler. Hesaplanan veriler Ortalama ± Standart Hata olarak verilmiştir. * $P < 0,05$ seviyesinde anlamlı farklılığı göstermektedir.

	Hasta (n=88)	***Kontrol (n=32)***
YAŞ	46,42 ± 1,1*	41,72 ± 1,6
BMI (Kg/m2)	30,12 ± 0,4*	25,74 ± 2,4
Apne/Hypoapne İndeksi	39,52 ± 2,5*	2,81 ± 0,3
Boyun Çevresi (cm)	42,49 ± 1,2*	39,97 ± 0,3
Bel Çevresi (cm)	107,00 ± 1,2*	97,22 ± 1,2
SpO_2, %	90,38 ± 0,3*	93,31 ± 0,4
Epworth uykululuk skalası	10,16 ± 0,6*	7,53 ± 0,9

Tablo 3.1.2. Hasta ve Kontrol grupları arasında Q ve R allel sayıları ve allel sıklıkları (parantez içinde % değer olarak verildi).

	Q	R	P değeri
Hasta	122 (69,3)	54 (30,7)	0,35
Kontrol	40 (62,5)	24 (37,5)	

Tablo 3.1.3. Hasta ve kontrol gruplarında lipid paneli ve kan basıncı arasındaki karşılaştırma değerleri. Hesaplanan veriler Ortalama ve Standart Sapma olarak verildi.

		Hasta	Kontrol	P değeri
LİPİD PANELİ	N	88	31	
Kolesterol (mg/dL)	Ort SS	200,18 41,28	196,00 44,15	,635
Trigliserit (mg/dL)	Ort SS	176,41 96,35	162,74 92,54	,494
HDL (mg/dL)	Ort SS	38,47 9,08	39,64 5,94	,503
LDL (mg/dL)	Ort SS	125,21 33,17	124,49 39,67	,922
KAN BASINCI	N	88	32	
Sistolik	Ort SS	121,65 16,94	116,00 15,44	,101
Diastolik	Ort SS	73,41 12,11	72,41 10,72	,680

Hasta ve Kontroller arasında Genotip dağılım sıklıkları Tablo 3.1.4' te verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (P>0,05). Genotip dağılımları ile Lipid paneli, kan basıncı ve SpO_2 değerleri Tablo 3.1.5'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1.4. Hasta ve Kontrol grupları arasında birey sayıları ve genotip dağılım sıklıkları (parantez içinde % olarak verildi).

	Toplam	GENOTİP						
		Co-Dominat Model			Dominant Model		Resesif Model	
		QQ	QR	RR	QQ	QR/ RR	QQ/ QR	RR
Hasta	88	41 (74,5)	40 (76,9)	7 (53,8)	41 (74,5)	47 (72,3)	81 (75,7)	7 (53,8)
Kontrol	32	14 (25,5)	12 (23,1)	6 (46,2)	14 (25,5)	18 (27,7)	26 (24,3)	6 (46,2)

Tablo 3.1.5. Genotip dağılımları ile Lipid paneli, kan basıncı ve SpO_2 değerleri. N=allel sayısı, Ort= Ortalama, SS= Standart Sapma' yı ifade etmektedir.

		Co-Dominant Model				Dominat Model			Resesif Model		
		QQ	**QR**	**RR**	**P**	**QQ**	**QR/ RR**	**P**	**QQ/ QR**	**RR**	**P**
Kolesterol (mg/dL)	N	55	51	13	0,957	55	64	0,993	106	13	0,776
	Ort	199,05	198,33	202,23		199,05	199,12		198,70	202,23	
	SS	38,62	48,24	29,02		38,62	44,83		43,30	29,02	
Trigliserit (mg/dL)	N	55	51	13	0,654	55	64	0,398	106	13	0,939
	Ort	180,84	163,75	174,77		180,84	165,98		172,61	174,77	
	SS	94,45	97,85	91,52		94,45	95,99		96,04	91,52	
HDL (mg/dL)	N	55	51	13	0,739	55	64	0,968	106	13	0,968
	Ort	38,74	39,22	37,18		38,74	38,80		38,74	38,80	
	SS	7,45	9,7	6,14		7,45	9,14		7,45	9,14	
LDL (mg/dL)	N	55	51	13	0,813	55	64	0,689	106	13	0,689
	Ort	123,64	127,3	121,82		123,64	126,21		123,64	126,21	
	SS	31,48	39,77	28,64		31,48	37,64		31,48	37,64	
Sistolik Kan basıncı	N	55	52	13	0,323	55	65	0,133	107	13	0,689
	Ort	122,64	117,94	118,38		122,64	118,03		120,36	118,38	
	SS	17,50	17,13	9,07		17,50	15,79		17,40	9,07	
Diastolik Kan basıncı	N	55	52	13	0,486	55	65	0,229	107	13	0,730
	Ort	74,55	71,92	72,08		74,55	71,95		73,27	72,08	
	SS	13,02	11,20	7,02		13,07	10,45		12,19	7,09	
SpO_2	N	55	52	13	0,486	55	65	0,815	107	13	0,233
	Ort	91,07	90,96	92,31		91,07	91,03		91,02	92,31	
	SS	3,73	3,69	3,30		3,73	3,63		3,69	3,30	

3.2. Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta Alt Gruplarının Karşılaştırılması

Obezitenin etkisini görebilmek için hasta grubu BMI indeksine göre Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta alt gruplarına ayrıldı. Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta grupları ile sürekli değişkenlerin analizi Tablo 3.2.1' de, genotip dağılım sıklıkları Tablo 3.2.2' de gösterildi. Tablo 3.2.1'de anlamlı çıkan veriler ile genotip dağılımları arasındaki etkileşim sonuçları Tablo 3.2.3' te gösterildi. Tablo 3.2.4' de Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta grupları arasında ki Q ve R allel sıklıkları verildi.

Tablo 3.2.1. Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta grupları ile sürekli değişkenlerin analizi

T-testi		Obez/Hasta	Zayıf/Hasta	P
	N	43	45	
Yaş	**Ort** **SS**	47,47 9,63	45,42 10,26	0,339
BMI	**Ort** **SS**	33,83 3,37	26,57 2,02	**0,000**
AHI	**Ort** **SS**	47,92 24,74	31,50 21,03	**0,001**
Boyun Çevresi	**Ort** **SS**	44,33 2,65	40,73 1,94	**0,000**
Bel Çevresi	**Ort** **SS**	116,05 8,64	98,36 5,94	**0,000**
Kolesterol (mg/dL)	**Ort** **SS**	201,88 198,55	42,82 40,18	0,708
Trigliserit (mg/dL)	**Ort** **SS**	179,58 99,17	173,38 94,60	0,765
HDL (mg/dL)	**Ort** **SS**	39,24 8,78	37,73 9,40	0,441
LDL (mg/dL)	**Ort** **SS**	125,81 33,57	124,63 33,16	0,868
Sistolik Kan basıncı	**Ort** **SS**	128,49 17,96	115,11 13,07	**0,000**
Diastolik Kan basıncı	**Ort** **SS**	76,51 12,51	70,44 11,06	**0,018**
SpO_2	**Ort** **SS**	88,65 4,25	92,02 2,00	**0,000**

Tablo 3.2.2. Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta grupları arasındaki genotip dağılım sıklıkları. Değerler genotip sayılarını ve sıklıklarını (parantez içinde % değeri) ifade etmektedir.

	Co-Dominant Model				**Dominant Model**			**Resesif Model**		
Alt Gruplar	**QQ**	**QR**	**RR**	**P**	**QQ**	**QR/ RR**	**P**	**QQ/ QR**	**RR**	**P**
Obez/Hasta	26 (60,5)	13 (30,2)	4 (9,3)	0,19	26 (60,5)	17 (39,5)	**0,01**	39 (90,7)	4 (9,3)	0,71
Zayıf/Hasta	15 (33,3)	27 (60,0)	3 (6,7)		15 (33,3)	30 (66,7)		42 (93,3)	3 (6,7)	

Tablo 3.2.3. Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta ile Genotip modelleri arasındaki etkileşim değerleri. Grup: 1 (Obez-Hasta), 2 (Zayıf-Hasta) ; Co-Dominant Model: AA, AB, BB, Dominant Model: AA ve AB/BB, Resesif Model (AA/AB ve BB).

	Co-Dominant Model*Grup 1-2	**Dominant Model*Grup 1-2**	**Resesif Model*Grup 1-2**
	P	P	P
BMI	0,357	0,232	0,249
AHI	0,864	0,483	0,838
Boyun Çevresi	0,171	0,51	0,588
Bel Çevresi	0,866	0,969	0,753
Sistolik Kan Basıncı	0,620	0,352	0,512
Diastoliik Kan Basıncı	0,540	0,380	0,315
SpO_2	0,724	0,677	0,505

Tablo 3.2.4. Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta gruplarında Q ve R allel sıklıkları.

	Q	**R**	**P**
Obez/Hasta	39 (75,6)	21 (24,4)	0,86
Zayıf/Hasta	57 (63,3)	33 (36,7)	

3.3. Zayıf/Hasta Alt Grubu ve Kontrol Grubunun Karşılaştırılması

Q223R polimorfizminin hastalığa etkisini görebilmek için Zayıf/Hasta ve Kontrol grubu arasında sürekli değişkenler Tablo 3.3.1'de, genotip dağılım değerleri Tablo 3.3.2'de karşılaştırıldı. Ayrıca Tablo 3.3.1'de anlamlı çıkan veriler ile genotip dağılım sıklıkları arasındaki etkileşim değerleri Tablo 3.3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3.1. Zayıf/Hasta ve Kontrol grupları ile sürekli değişkenler

		Zayıf/Hasta	Kontrol	P
	N	45	32	
Yaş	**Ort**	45,42	41,72	0,112
	SS	10,26	9,02	
BMI	**Ort**	26,57	25,74	0,107
	SS	2,02	2,43	
AHI	**Ort**	31,50	2,81	**0,000**
	SS	21,03	1,95	
Boyun Çevresi	**Ort**	40,73	39,97	0,102
	SS	1,94	2,07	
Bel Çevresi	**Ort**	98,36	97,22	0,443
	SS	5,94	6,94	
Kolesterol (mg/dL)	**Ort**	198,55	196,00	0,794
	SS	40,18	44,15	
Trigliserit (mg/dL)	**Ort**	173,38	162,74	0,628
	SS	94,60	92,54	
HDL (mg/dL)	**Ort**	37,73	39,64	0,320
	SS	9,40	5,94	
LDL (mg/dL)	**Ort**	124,63	124,49	0,987
	SS	33,16	39,67	
Sistolik Kan Basıncı	**Ort**	115,11	116,00	0,786
	SS	13,07	15,44	
Diastolik Kan Basıncı	**Ort**	70,44	72,41	0,440
	SS	11,06	10,72	
SpO_2	**Ort**	92,02	93,31	**0,016**
	SS	2,00	2,59	

Tablo 3.3.2. Zayıf/Hasta ve Kontrol grupları arasında genotip dağılım sıklıkları. Değerler genotip sayılarını ve sıklıklarını (parantez içinde % değeri) ifade etmektedir.

	Co-Dominant Model			**Dominant Model**		**Resesif Model**	
Alt Gruplar	**QQ**	**QR**	**RR**	**QQ**	**QR/ RR**	**QQ/ QR**	**RR**
Zayıf/Hasta	15 (33,3)	27 (60,0)	3 (6,7)	15 (33,3)	30 (66,7)	42 (93,3)	3 (6,7)
Kontrol	14 (43,8)	12 (37,5)	6 (18,8)	14 (43,8)	18 (56,2)	26 (81,2)	6 (18,8)

Tablo 3.3.3. Zayıf/Hasta ve Kontrol grupları ile Genotip dağılımları arasında etkileşim değerleri.

	Co-Dominant Model*Grup 2-3	**Dominant Model*Grup 2-3**	**Resesif Model*Grup 2-3**
	P	P	P
AHI	0,681	0,857	0,390
SpO_2	0,647	0,823	0,366

4. TARTIŞMA

Obstrüktif uyku apne/hipoapne sendromu çok sayıda genin kontrolünde, çeşitli çevresel faktörler ve gelişimsel faktörler tarafından etkilenen kompleks bir hastalıktır. Bu hastalık tekrar eden üst havayolu tıkanmalarına eğilim gösterir. Bu eğilim üst havayolu boyutu veya fonksiyonunu etkileyen nöromüsküler ve anatomik faktörler tarafından belirlenir. OSAHS için en güçlü risk faktörleri obezite ve erkek cinsiyetidir (Redline ve Tishler 2000). Uyku düzensizliği şikâyeti olmayanların %40'ı, bariatrik cerrahi altındaki adolesanların % 55'i ve morbid obezlerin %71'inden fazlası OSAHS göstermektedir (Sousa ve ark 2008).

Hem hayvan hem de insan çalışmaları Leptin ve LEPR'nin obezite mekanizmasında önemli ve güçlü olduğunu göstermiştir. Leptin sinyal kaybı insanda ciddi obeziteye sebep olmaktadır ve dolaşımdaki leptin konsantrasyonu BMI ile pozitif bir ilişkiye sahiptir (Clement ve ark 1998, Considine ve ark 1996). Japon popülasyonunda 130 OSAHS'lı hasta ve 50 sağlıklı kontrol grubu ile yapılan çalışmada Leptin genindeki tetranükleotid tekrarları ve LEPR'de ki Lys109Arg, Gln223Arg (P=0,420), Lys656Asn polimorfizimleri ile OSAHS arasında bir ilişki bulunmamıştır. OSAHS'lı hastalar içinden oluşturulan obez/hasta ve zayıf/hasta alt grupları arasında dominant modelde genotip bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (P=0,064) (Hanaoka ve ark 2008).

Popko ve ark (2007) leptin reseptöründeki Gln223Arg polimorfizmini 102 OSAS'lı hasta ve apnesi olmayan 77 kontrol ile karşılaştırmışlar; OSAHS' lı ve kontrol grupları arasında Gln/Gln, Gln/Arg ve Arg/Arg genotip sıklıklarını anlamlı bulmuşlardır (P=0,03). OSAHS' lı grupta homozigot genotipli (Arg/Arg) ve heterozigot genotipli (Gln/Arg) Arg alleli sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuşlardır (P=0,01). Benzer bir ilişki kadın gruplarında da belirlenmiştir (P=0,02). Tersine homozigot genotipi (Gln/Gln) kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (P=0,01) Erkek hasta ve kontrol gruplarının genotip sıklıklarında bir farklılık bulunmamıştır. Ayrıca lipid anormallikleri ve LEPR polimorfizmi arasındaki ilişkiye bakılmış; sadece Arg alleli taşıyan OSAHS' lı erkeklerde total kolestrol seviyelerinde anlamlı bir farklılık görülmüştür (P=0,05).

Ayrıca LDL ve HDL ortalamaları ile Q223R polimorfizmi arasında ki ilişki incelenmiş, Arg/Arg alleli taşıyıcılarında en yüksek, Gln/Arg alleli taşıyıcılarında düşük, Gln/Gln alleli taşıyıcılarında en düşük seviyede gözlenmiştir. Dahası trigliserit seviyeleri ile HDL, LDL seviyeleri arasında ters bir eğilim olduğu görülmüştür. Arg alleli mevcudiyetinin leptin reseptörü fonksiyonunu etkileyebileceği buna bağlı olarak da OSAHS gelişiminin bir sebebi olan adipoziteye yol açabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Çin kuzey bölgesi "Han" popülâsyonunda 103 OSAHS'lı hasta ve 78 OSAHS olmayan bireyin katıldığı çalışmada, iki grup arasında Gln223Arg polimorfizmi açısından farklılık bulunmamıştır (P=0,676). GG genotipli OSAHS'lı hastalar ile GA+AA genotipli OSAHS' lı hastalar arasında boyun çevresi (P=0,031) hariç BMI, trigliserit, kolesterol, insülin, leptin, bel-kalça oranı, kan basıncı, tokluk kan şekeri bakımından anlamlılık tespit edilmemiştir (Huang ve ark 2003).

Türk popülasyonunda Mergen ve ark (2006) tarafından yapılan bir çalışmada obezite ile LEPR Q223R polimorfizm sıklığı arasında ilişki saptanmamıştır. Ben Ali ve ark (2009) Tunus popülasyonunda, LEPR Q223R polimorfizminin obez bireyler arasında dolaşımdaki düşük leptin seviyeleri ve sadece erkek bireylerde düşük BMI ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Duarte ve ark (2006) Brezilya popülasyonunda obezlerde bulunan LEPR Q223R gen polimorfizminin rolünü belirlemek için obez ve obez olmayan bireylerde yaptıkları çalışmada bu polimorfizmin obezite ile güçlü bir ilişkisinin olduğunu bulmuşlardır. Duarte ve arkadaşlarının (2007) yaptığı diğer bir çalışmada genetik geçmişi ve orijini farklı 200 obez ve 150 zayıf sağlıklı Brezilyalı bireyde BMI ile adrenerjik reseptör (β3-AR) p.W64R, Leptin c.-2548G>A ve LEPR p.Q223R gen varyantları arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Zayıf ve obez bireylerde (β3-AR) p.W64R ve Leptin c.-2548G>A polimorfizimlerinin genotip sıklığında anlamlı bir farklılık bulamamışlar, ancak LEPR p.Q223R varyantı normal ve obez grupları ile co-dominant (P=0,05) ve dominant model (P=0,03) genotip sıklıkları arasında anlamlı olarak farklılık tespit etmişlerdir. Sonuçta leptin reseptöründeki genetik değişkenliğin vücut ağırlığının düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Guizar-Mendoza ve ark (2005) yaptıkları çalışmada Meksikalı adolesanlarda ki LEPR geni Gln223Arg polimorfizminin hemodinamik ve obezite ile alakalı metabolik bozukluklar ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. İnsan LEPR geninin yaygın birkaç polimorfizmi ve nadir varyantları, geniş olarak popülasyon tabanlı ilişki yaklaşımı kullanılarak, bunların obezite ile potansiyel ilişkisi farklı popülasyonlarda değerlendirilmiştir. Örneğin, obezite fenotipleri ve Gln223Arg (Q223R) polimorfizmi arasındaki ilişki, Amerikalı beyazlar, Pima yerlileri (güney Arizona-ABD ve kuzey Meksika arasındaki yerliler), siyahlar ve Japonlar hariç orta yaşlı beyaz erkekler, post menopozal beyaz kadınlar, Akdenizli bir popülasyon ve genç Hollandalı yetişkinlerde gözlenmiştir. Ayrıca LEPR gen lokusu ve adipozite (yağlanma) arasındaki bağlantı Fransız beyazlarda gözlenmesine rağmen bu bağlantı Pima yerlileri ve Meksikalı Amerikalılarda gözlenmemiştir. (Liu ve ark 2004). Gotoda ve ark. (1997) 190 obez (BMI >28kg/m²) ve 132 zayıf (BMI <22 kg/m²) beyaz İngiliz erkekleri ile yaptıkları çalışmada Q223R polimorfizmininde dahil olduğu leptin reseptör genindeki mutasyonların insan obezitesinin yaygın bir sebebi olmadığını göstermişlerdir. Matsuoka ve ark (1997) leptin reseptör genindeki mutasyonların insanda obeziteye sebep olup olmadığını açıklamak için obez Japon bireylerde Ob-Rb (leptin reseptörü uzun izoformu) genindeki mutasyonları taramışlardır. Mevcut çalışmada obez ve obez olmayan bireyler arasında Ob-Rb genindeki 7 dizi varyantının (Lys109Arg, Gln223Arg, Ser343Ser, Ser492Thr, Lys656Asn, Ala976Asp ve Pro1019Pro) her birinin allel sıklıklarında anlamlı bir farklılık bulamamışlardır. Çalışma sonunda Ob-Rb kodlanan bölgedeki dizi varyantlarının obezite ile direkt ilişkili olmadığını ortaya koymuşlardır.

OSAHS ve LEPR Q223R polimorfizmi arasında çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Şimdiye kadar ki yapılan çalışmaların çoğunluğu LEPR Q223R polimorfizmi ile obezite arasındadır.

İnsan leptin reseptör geninin Q223R polimorfizmi ile OSAHS arasındaki ilişkiyi araştırdığımız bu çalışmada OSAHS' lı 88 erkek hastanın 43' ü obez/hasta (BMI >30) ve 45' i zayıf/hasta (BMI<27) idi. Kontrol grubu 32 normal bireyden oluşturuldu (BMI <27). Önce Hasta ve Kontrol grupları yaş, BMI ve PSG karakteristikleri bakımından karşılaştırıldı ve bulgularda anlamlı bir farklılık vardı (Tablo 3.1.1). Ayrıca Tablo 3.1.2'de görüldüğü gibi hasta ve kontrol gruplarının Q ve R allel sıklıkları hesaplandı ve Hardy–Weinberg eşitliğine uygun bulundu.

Hasta ve Kontrol grupları kolesterol, trigliserit, HDL, LDL, kan basıncı (sistolik ve diastolik) değişkenleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 3.1.3). Tablo 3.1.4' te hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları bakımından karşılaştırılmış ve aralarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır [co-dominant model (P=0,23), dominant model (P=0,78), resesif model (P=0,92)]. Ayrıca genotip dağılımları ve değişkenler arasında da anlamlı bir farklılık bulamadık (Tablo 3.1.5).

LEPR Q223R polimorfizminin sadece obeziteye etkisini görebilmek için obez/hasta ve zayıf/hasta gruplarını değerlendirdik. Gruplar arasındaki Q ve R allel sıklıkları Tablo 3.2.4'te verilmiştir. Bu iki grup arasında BMI (P<0,001), AHI (P=0,001), boyun çevresi (P<0,001), bel çevresi (P<0,001), sistolik (P<0,001) ve diastolik (P=0,018) kan basıncı ve oksijen (P<0,001) düzeylerinde istatistiksel olarak fark vardı (Tablo 3.2.1). Bu 2 grup arasında co-dominant ve resesif modele ait genotip dağılımı ve sıklıklarında anlamlı bir farklılık yoktu (Tablo 3.2.2). Fakat dominant modelde (P=0,01) anlamlı bir farklılık vardı. Genotip dağılımları ve gruplar arasında general linear model ile etkileşimine baktığımızda BMI, AHI, boyun ve bel çevresi, kan basıncı ve oksijen düzeylerine göre anlamlı fark saptanmadı (Tablo 3.2.3).

LEPR Q223R polimorfizminin hastalığa direkt etkisini görmek için zayıf/hasta ve kontrol grupları benzer açılardan değerlendirildi (Tablo 3.3.1, 3.3.3). Sadece AHI bakımından bir anlamlılık tespit edildi (P <0,001). Bu 2 grup arasında genotip dağılımları ve allel sıklıkları bakımından anlamlı bir farklılık yoktu (Tablo 3.3.2.).

Popko ve ark (2007) Q223R polimorfizminin genotip dağılımları ve lipid paneli sonuçlarında anlamlı bir farklılık bulmuşlardır. Bu farklılığın mutant (Arg/Arg) ve heterozigot (Gln/Arg) genotipli bireylerin sıklığıının kontrollere göre yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda ise Q223R polimorfizminin genotip dağılımları ve lipid paneli sonuçları karşılaştırıldığında Arg alleli taşıyan genotiplerin sıklığında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Duarte ve ark (2006, 2007) Brezilya popülasyonunda BMI indeksine göre ayarlanmış hem erkek hem de kadın bireylerin dahil edildiği normal ve obez gruplar ile LEPR Q223R polimorfizmi arasında vücut kompozisyonunun düzenlenmesi ile ilişkili çalışmalarda anlamlı sonuçlar elde etmişlerdir. Bu sonuçlar, arginin alleli içeren genotiplerin sıklığından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda ortaya çıkan bulgular Duarte ve ark (2006, 2007) yaptığı çalışma ile farklılık göstermektedir.

Çalışmamızın sonuçları Hanaoka ve ark (2008), Huang ve ark (2003) tarafından yapılan OSAHS ve LEPR Q223R polimorfizminin ilişkisini açıklayan çalışmaları desteklemektedir. Sadece Hanaoka ve ark'ın obez/hasta ve zayıf/hasta bireyler arasındaki dominant modelde saptanan (P=0,064) sonucun aksine bizim çalışmamızda bu sonuç anlamlı çıkmıştır (P=0,01). Bu farklılığın heterozigot (QR) bireylerin sıklığından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Gotoda ve ark (1997), Matsuoka ve ark (1997), Mergen ve ark' ın (2006) yaptıkları obezite ile ilgili çalışmalarda LEPR genindeki yaygın polimorfizimlerin insan obezitesi ile ilgili olmadığı sonucuna varmışlardır. Bu veriler Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta grupları arasında LEPR Q223R polimorfizminin genotip dağılımları ve allel sıklıklarının da değerlendirildiği çalışmamızın bulguları ile uyumludur.

Sonuç olarak Konya popülasyonunda Q223R polimorfizmi ile OSAHS arasında bir ilişki bulunmamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

OSAHS çok sayıda gen içeren, çeşitli çevresel faktörler, gelişimsel faktörler tarafından etkilenen kompleks bir hastalıktır. Baş ve yüz şekli, solunum kontrolü, sempatik sinir sistemi aktivitesi, bağ dokusu gevşekliği, kas yorgunluğu, hormon seviyeleri ve obezite gibi özellikler OSAHS gelişiminde aday faktörlerdir (Thompson ve ark 1997). Bu nedenlerle çok odaklı bir hastalık olan OSAHS tek bir gen polimorfizmi tarafından belirlenmeyebilir. Ancak diğer faktörler gibi genetik yatkınlığın saptanmasıda önem taşımaktadır.

Bizim çalışmamızda ortaya çıkan bulgular Konya popülasyonunda LEPR Q223R polimorfizmi ile OSAHS arasında bir ilişkinin olmadığını gösterdi. Obez ve zayıf bireylerin karşılaştırılmasında ortaya çıkan anlamlı bulgular obezitenin OSAHS gelişiminde önemli rol aldığını düşündürmektedir. Leptin reseptöründe belirlenmiş diğer polimorfizmlerinde OSAHS gelişimine etkisinin moleküler tarama yöntemleri kullanılarak yeteri kadar veri bulunmayan Türk popülasyonunda araştırılması uygun olacaktır. OSAHS gibi multifaktöriyel hastalıklarda genetik temelin belirlenmesi için benzer çalışmaların yaygınlaşmasına ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA POPÜLASYONUNDA İNSAN LEPTİN RESEPTÖR GENİNDEKİ GLN223ARG POLİMORFİZMİ İLE OSAHS ARASINDA İLİŞKİ ANALİZİ

Serkan KÜÇÇÜKTÜRK

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2009

Obstrüktif apne/hipoapne sendromu obez bireylerde yaygın görülen çok odaklı bir hastalıktır. Obezite ve OSAHS çoklu patofizyolojik mekanizmaları paylaşmaktadır. Leptin hormonu yağ hücrelerinde üretilen ve metabolik kontrolde önemli rolü olan bir sinyal faktörüdür. Leptin iştah ve enerji harcanmasının düzenlenmesinden sorumludur. Leptinin spesifik reseptörü olan LEPR genellikle hipotalamusta işlevseldir. Bu çalışmanın amacı OSAHS ile LEPR genindeki Q223R polimorfizmi arasındaki ilişkiyi açıklamaktır.

Çalışmaya Konya popülasyonundan cinsiyeti erkek 88 hasta ve 32 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu dahil edilmiştir. Bütün hasta ve kontrol bireylerine polisomnografi testi uygulanmıştır. Q223R polimorfizminin 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. Q223R polimorfizminin genotip dağılımını belirlemek için PZR-RFLP moleküler tanı yöntemi ve MspI restriksiyon enzimi kullanılmıştır.

Hasta ve Kontrol bireylerinin arasında yaş, BMI ve PSG karakteristikleri bakımından anlamlı bir farklılık vardı; ancak Hem gruplar hem de genotip dağılımları ve allel sıklıkları arasında lipid paneli ile kan basıncına göre anlamlı bir farklılık bulamadık. Obez/Hasta ve Zayıf/Hasta grupları arasında BMI ($P<0,001$), AHI ($P=0,001$), boyun çevresi ($P<0,001$), bel çevresi ($P<0,001$), sistolik ($P<0,001$) ve diastolik ($P=0,018$) ve SpO_2 ($P<0,001$) arasında anlamlı bir fark vardı. Anlamlı çıkan değişkenlere göre genotip dağılımları ve allel sıklıkları arasında bir etkileşim belirlenmedi. Sadece dominant modelde (QQ-QR/RR) anlamlı bir fark vardı ($P=0,01$). Zayıf/Hasta ve Kontrol grupları benzer açılardan değerlendirildi. Anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Sonuç olarak Q223R polimorfizmi ile OSAHS arasında bir ilişki saptanmadı. Leptin reseptöründe belirlenmiş diğer polimorfizmlerin moleküler tarama yöntemleri kullanılarak yeteri kadar veri bulunmayan Türk popülasyonunda leptin reseptörünün OSAHS gelişimine etkisinin araştırılması uygun olacaktır.

Anahtar Sözcükler: OSAHS; LEPR; Polimorfizm; Q223R; PZR-RFLP

7. SUMMARY

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

THE ANALYSIS OF RELATION BETWEEN OSAHS AND GLN223ARG POLYMORPHISM IN HUMAN LEPTIN RECEPTOR GENE IN KONYA POPULATION

Serkan KÜÇÇÜKTÜRK

Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı

Yüksek Lisans Tezi / KONYA 2009

Obstructive Sleep Apnea/Hypoapnea Syndrome is a multifactorial disease widely seen in obese individuals. Obesity and OSAHS have shared multi physiopathological mechanisms. Leptin hormone is a adipocyte-derived signaling factor that has an important role in metabolic control. Leptin is responsible for energy expenditure and reduction of food intake and Leptin's specific receptor (LEPR) is generally functional in hypothalamus. The aim of this study was to investigate the relation between OSAHS and Q223R polymorphisms in LEPR.

Our study was included 88 patients and 32 healthy control individuals who were all male, from Konya populations. Diagnostic polysomnography was performed in all patients and control individuals.To see the effect on obesity of Q223R polymorphism was 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. The distribution of genotyping of Q223R polymorphism was determined with the method PCR-RFLP of a molecular diagnostic and MspI restriction enzyme was used.

There were statistically significant difference between patients with OSAHS and control individulas in terms of age, BMI, PSG characteristics. Between both groups and distributions of genotyping we could not find statistically significant difference in terms of blood pressure and blood lipids. There were statistically significance differences between subgroups of Weak/Patients and Obese/Patients in term of BMI, AHI, neck and waist circumference, systolic and diastolic blood pressure and SpO_2. According to significant results of variables, any interaction was not determined between distributions of genotyping and allel frequencies. There was statistically significant difference only in dominant model. Weak/patients and control groups were also evaluated in the same criterias; it was not found any statistically significant difference.

Consequently, it was not determined any relation between Q223R polymorphism and OSAHS. By using molecular research methods of other polymorphisms in Leptin receptor, it is necessary to search the effect of Leptin receptor on OSAHS in Turkish population that there has not enough data. It needs to widespread studies for determination of genetic basic on multifactorial patients like OSAHS.

Key Words: OSAHS; LEPR; Polymorphism; Q223R; PCR-RFLP

8. KAYNAKLAR

Akarsu A.N, Çakır B Psikiatrik genetik araştırmalarda kullanılabilecek genetik yöntemler: IV-A.Hastalık Geni Haritalanması. 2004: 3P Dergisi; Cilt; 12 Ek Sayı:1, 31-48

Akarsu AN. Genetik hastalıklara neden olan genlerin saptanmasında aile ağacı analizlerinin önemi. Hacettepe Tıp Dergisi. 1999; 30(1), 85-91.

Aslan K, Serdar Z, Tokullugil HA. Multifonksiyonel Hormon: Leptin. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.2004; 30 (2) 113-118.

Ben Ali S, Kallel A, Sediri Y, Ftouhi B, Feki M, Slimene H, Jemaa R, Kaabachi N. LEPR p.Q223R Polymorphism Influences Plasma Leptin Levels and Body Mass Index in Tunisian Obese Patients. Archives of Medical Research. 2009; 40: 186-190

Brock DJH. Molecular Genetics for the Clinician. Cambridge University Pres. 1993

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

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

Cooper G.M, Hausman R.E Hücre: Moleküler Yaklaşım, 3. Baskı İzmir Tıp Kitabevi İzmir. 2006: 145-148

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

Dib C, Faure S, Fizames C et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. 1996: Nature; 380, 1-138.

Duarte SFP, Francischetti EA, Genelhu-Abreu V, Barroso SG, Braga JU, Cabello PH, Pimentel MM. p.Q223R Leptin Receptor Polymorphism Associated with Obesity in Brazilian Multiethnic Subjects. American Journal of Human Biology. 2006; Jul-Aug; 18(4): 448–453

Duarte SFP., Francischetti EA., Genelhu VA., Cabello PH., Pimentel MMG., LEPR p.Q223R, β3-AR p.W64R ve LEP c.-2548G>A gene variants in obese Brazilian subjects. Genetics and Molecular Research. 2007; 6 (4):1035–1043

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; Vol.6, No.6 869–876

Guilleminault C, Eldridge F, Dement WC. Insomnia with sleep apnea: a new syndrome. Science. 1973; 181: 856–8.

Guilleminault C., Abad VC. Obstructive sleep apnea syndromes. The Medical Clinics of North America. 2004; 88: 611–630

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

Hanaoka M, Yu X, Urushihata K, Ota M, Fujimoto K, Kubo K. Leptin and Leptin Receptor Gene Polymorphisms in Obstructive Sleep Apnea Syndrome. Chest. 2008;133;79–85

Houwelingen KG, Uffelen R, Vliet ACM. The sleep apnoea syndromes. European Heart Journal. 1999; 20: 858– 866

Huang R, Huang XZ, Li M, Xiao Y, Zhang J. An investigation of the relationship between Lepr gene Gln223Arg polymorphism and obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. 2003; Sep; 26(9): 517-21.

Kaparianos A, Sampsonas F, Karkoulias K, Spiropoulos K. Obstructive sleep apnoea syndrome and genes. The Journal of Medicine. 2006; Vol. 64: No. 8, Netherlands

Köktürk O. Tüberküloz ve Toraks Dergisi.1998;46(2):187–192

LEPR Q223R (**A→G)** NCBI-SNP yerleşim haritası. 15.06.2008 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NT_032977.8?report=graph&m=36030432&v=36030382:36030482&c=3366FF&theme=Details&flip=false&select=null&content=5&color=0&decor=0&layout=0&spacing=0

Leland J. Cseke, Peter B. Kaufman, Gopi K. Podila, Chung-Jui T: Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, pp: 1-24, CRC Press, New York, 2004.

Liu YJ, Sonia MS Rocha-Sanchez, Liu PY, Long JR, Yan Lu, Leo Elze, Robert R. Recker, Hong-Wen Deng. Tests of linkage and/or association of the LEPR gene polymorphisms with obesity phenotypes in Caucasian nuclear families. Physiol Genomics. 2004;17: 101–106

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

Matsuoka N, Ogawa Y, Hosoda K, Matsuda J, Masuzaki H, Miyawaki T, Azuma N, Natsui K, Nishimura H, Yoshimasa Y, Nishi S, Thompson D.B, Nakao K. Human leptin receptor gene in obese Japanese subjects:evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity. Diabetologia. 1997; 40:1204-1210

Mergen H, Karaaslan C, Mergen M, Deniz Ozsoy E, Ozata M. LEPR, ADBR3, IRS-1 and 5-HTT genes polymorphisms do not associate with obesity. Endocr J. 2007; 54: 89-94.

OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601007. 15.05.2009

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

Redline S, Tishler PV. The genetics of sleep apnea. Sleep Medicine. 2000; Reviews, Vol. 4, No. 6, pp 583–602

Sean MC, Apoor SG, Virend KS. Obstructive Sleep Apnea. Ann Intern Med. 2005;142:187-197.

Sousa AGP, Cercato C, Mancini MC, Halpern A. Obesity and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. International Association for the Study of Obesity. 2008; obesity reviews, 9: 340-354

Thompson DB, Ravussin E, Bennett PH, Bogardus C. Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. Hum Mol Genet. 1997; 6: 675–679.

Yiannakourıs N, Yannakoulıa M, Melistas L, Chan JL, Klimis-Zacas D, C. S. Mantzoros The Q223R Polymorphism of the Leptin Receptor Gene Is Significantly Associated with Obesity and Predicts a Small Percentage of Body Weight and Body Composition Variability. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2001; 86(9): 4434–4439

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994; 372:425-32.

9. EKLER

EK-1.

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

- Bu çalışmanın amacı OSAHS (Obstructive Sleep Apnea Hypoapnea Syndrome) ile Gln223Arg LEPR gen polimorfizmi arasında bir ilişkinin olup olmadığını araştırmaktır.
- Araştırmaya gönüllü olarak katılacak kişilerden laboratuar materyali olarak 10 ml EDTA'lı tüplere periferal kan alınacaktır. Bu kan alma işlem uyku laboratuarı teknisyenleri tarafından uygulanacaktır. Genelde bu işlemin hiçbir sakıncası yoktur.
- Bu araştırma yaklaşık bir yıl sürecek, bu süre içerisinde ve sonrasında kimliğiniz gizli tutulacaktır, bilgileriniz ve test sonuçları bilimsel yayınlar, sunumlar dışında kesinlikle kullanılmayacaktır.
- Yapılacak çalışma size hiçbir mali yükümlülük getirmeyecektir.
- Çalışmaya yaklaşık 300 kişinin katılması hedeflenmektedir.
- Bu çalışma sonucunda size ya da ailenize bir yarar getirip getirmeyeceğini şimdiden söylemek mümkün değildir ve bu konuda size bir söz veremeyiz.
- Çalışma olumlu sonuçlanırsa genetik çalışmalarımızın hastalıkların moleküler temelini anlamamıza katkıda bulunarak insan sağlığına yarar sağlamasını beklemekteyiz.
- Çalışmaya katılma tamamen isteğe bağlıdır. İstediğiniz zaman çalışmaya katılmaktan vazgeçebilirsiniz. Bu durumda sizden almış olduğumuz örnek yok edilecektir.
- Bu formu imzalamadan önce, çalışmayla ilgili sorularınız varsa lütfen sorun. Daha sonra sorunuz olursa Dr. Şebnem YOSUNKAYA' ya sorabilirsiniz.
  (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 Serkan KÜÇÜKTÜRK

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

1979 yılında Konya'nın Ereğli ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Konya'da tamamladı. 1997-1999 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuar bölümünü bitirdi. Lisans öğrenimini Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde tamamladı. 2007 yılında S.Ü. Göğüs Hastalıkları Uyku Laboratuarında uyku teknisyeni olarak çalışmaya başladı uzman uyku teknisyeni olarak halen bu görevde çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.