

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LEPTİN RESEPTÖRÜ VE HİPOKSİ-İNDÜKLENEBİLİR
FAKTÖR-1ALFA GENLERİNDEKİ POLİMORFİZMLERİN
OSAHS’LA İLİŞKİSİ**

Sümevra ÇETİNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Sennur DEMİREL

KONYA-2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LEPTİN RESEPTÖRÜ VE HİPOKSİ-İNDÜKLENEBİLİR
FAKTÖR-1ALFA GENLERİNDEKİ POLİMORFİZMLERİN
OSAHS’LA İLİŞKİSİ**

SümeYra ÇETİNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Sennur DEMİREL

Bu proje Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü

Tarafından 11202005 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA–2013

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışmanım Prof. Dr. Sennur DEMİREL'e ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen bölüm öğretim üyelerimiz Yard. Doç. Dr. A.Bülent TURHAN, Yard. Doç. Dr. H.Gül DURSUN'a

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

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

Bilgi ve deneyimlerini paylaşan Serkan KÜÇÇÜKTÜRK'e

Tezin kontrolleri esnasında zaman ayırıp destekleriyle yanımda olan anatomi bölümü asistanlarından Döndü AKIN ve Didem AYDIN'a ve sevinç ve hüzneleri beraber paylaştığımız İlknur ÇINAR'a,

Eğitim ve tez aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ÇİZELGELER.....	viii
ŞEKİLLER.....	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Uykuda Solunum Bozuklukları	1
1.2. Uyku Apne Sendromu	1
1.2.1. Genel Özellikler	2
1.2.2. Epidemiyoloji	3
1.2.3. Etiyoloji.....	4
1.2.4. Klinik Özellikler	4
1.2.5. Polisomnografi	5
1.3. Obezite, Leptin, Leptin Reseptörü	5
1.3.1. Obezite	5
1.3.2. Leptin	6
1.3.3. Leptin Reseptörü (LEPR)	8
1.3.4. Leptin Reseptörü Gen Polimorfizmleri.....	8
1.4. Hipoksi ve Hipoksiyle İndüklenen 1- α (HIF-1 α) Geni	9
1.4.1. Hipoksi ve OSAHS İlişkisi	9
1.4.2. İntermittent (Aralıklı) Hipoksi	9
1.4.3. Kronik İntermittent(Aralıklı) Hipoksi	10
1.4.4. Hipoksiyle İndüklenen Faktör 1 α (HIF-1 α) Geni.....	10
1.4.5. HIF-1 α 'nın Hedef Genleri.....	14
1.5.Obezite, HIF-1 α Geni ve Leptin Arasındaki Bağlantılar.....	15
1.6.Leptinin Uyardığı Sinyal Yolakları ve HIF-1 α Bağlantısı.....	15

1.7. Amaç.....	17
2.GEREÇ ve YÖNTEM.....	19
2.1. Hasta Kabulü	19
2.2. Çalışma gruplarının oluşturulması	19
2.3. Uyku Çalışması.....	19
2.4. Hastadan kan alınması	20
2.5. Genomik DNA izolasyonu	20
2.5.1. İzolasyonda kullanılan çözeltiler.....	21
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	22
2.7. Agaroz Jelde Görüntüleme	24
2.8. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	24
2.9. ARMS (Amplifikasyon Refraktör Mutasyon Sistem).....	25
2.9.1. Agaroz Jelde Görüntüleme.....	25
2.10. İstatistiksel değerlendirme	25
2.11. Etik Kurul Onayı	26
3. BULGULAR	27
3.1. Pro582Ser Polimorfizmini İçine Alan Gen Bölgesinin PZR Sonuçları.....	27
3.2. Lys109Arg Polimorfizmini İçine Alan Gen Bölgesinin PZR Sonuçları.....	28
3.3. Lys109Arg Bölgesi PZR Ürünlerinin HaeIII Restriksiyon Enzimi ile Kesimi.....	28
3.4 Lys656Asn Polimorfizmini İçine Alan Gen Bölgesinin PZR Sonuçları.....	29
3.5. Lys656Asn Bölgesi PZR Ürünlerinin BstU1 Restriksiyon Enzimi ile Kesimi.....	29
3.6. Pro582Ser Polimorfizminde Hasta ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması.....	30

3.7. Lys109Arg Polimorfizminde Hasta ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması.....	34
3.8. Lys656Asn Polimorfizminde Hasta ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması.....	36
4. TARTIŞMA	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	46
6. ÖZET.....	47
7. SUMMARY	48
8. KAYNAKLAR	49
9. EKLER	54
EK-A. ETİK KURUL ONAYI.....	54
EK-B. BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU.....	55
10. ÖZGEÇMİŞ	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

AHI: Apne/Hipoapne İndeksi

ARNT: aryl hidrokarbon reseptör
nükleer translokator

ARMS: Amplifikasyon Refraktör
Mutasyon Sistem

bç: Baz çifti

bHLH: basic helix loop heliks

BMI: Body Mass Index

CBR: CREB bağlanma bölgesi

CIH: Kronik İntermittent Hipoksi

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

EEG: Elektroensefalogram

EKG: Elektrokardiyogram

EMG: Elektromyogram

EOG: Elektrookülogram

EPO: Eritropoietin

EtBr: Etidyum Bromür

EtOH: Etanol

FIH: Faktör İnhibe edici HIF

HDL: High-Density Lipoprotein

HIF-1 α : Hipoksiyle İndüklenen
Faktör-1 α

HRE: Hipoksi Yanıt Elementi

ICSD: Uluslararası Uyku Apne
Sendromu Sempozyumu

IL-6: İnterlökin 6

IL-12: İnterlökin 12

JAK: Janus-aktive kinaz

LDL: Low-Density Lipoprotein

LEPR: Leptin Reseptörü

mRNA: Messenger RNA

NaAc: Sodyum Asetat

NHANES: National Health and
Nutrition Examination Survey

Ob gen: obezite geni

OB-Ra: Kısa reseptör

OB-Rb: Uzun reseptör

OD: Optik Dansite

ODD: Oksijen Bağlama Bölgesi

OSAHS: Obstructive Sleep
Apnes/Hypoapnes Syndrome

pmol: pikomol

PO₂: Parsiyel Oksijen Basıncı

PHD: Prolil Hidroksilaz Domain

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

PSG: Polisomnografi

REM: Rapid Eye Movement

RFLP: Restriction Fragment Length
Polymorphism

RNA: Ribonükleik Asit

ROS: Reaktif Oksijen Ürünleri

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SNP: Single Nucleotid Polymorphisms

Tris: Tris (hidroksimetil) aminometan

ul: Mikrolitre

USB: Uykuda Solunum Bozuklukları

VEGF: Vasküler Endotelyal Growth Faktör

STAT: Sitozolik Transkripsiyon

Aktivatörü

SREBP-1: sterol düzenleyici element

bağlama protein-1

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları (Lys109Arg ve Lys656Asn için)

Çizelge 2.1. Pro582Ser için PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları

Çizelge 3.1. Tüm SNP'lere hasta ve kontrol gruplarında Yaş, BMI ve PSG karakteristiklerine ait değerler

Çizelge 3.2. Pro582Ser polimorfizminde hasta ve kontrol grupları arasında birey sayıları ve genotip dağılım sıklıkları

Çizelge 3.3. Pro582Ser polimorfizminde hasta gruplarında AHI ve BMI'ya göre ayrılmış alt grupların genetik modellerle karşılaştırılması

Çizelge 3.4. Pro582Ser polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin kodominant modelde karşılaştırılması

Çizelge 3.5. Pro582Ser polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin dominant ve resesif modelde karşılaştırılması

Çizelge 3.6. Pro582Ser polimorfizminde hasta ve kontrol grupları arasında birey sayıları ve genotip dağılım sıklığı değerleri

Çizelge 3.7. Lys109Arg polimorfizminde hasta gruplarında AHI ve BMI'ya göre ayrılmış alt grupların genetik modellerle karşılaştırılması

Çizelge 3.8. Lys109Arg polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin kodominant modelde karşılaştırılması

Çizelge 3.9. Lys109Arg polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin dominant ve resesif modelde karşılaştırılması

Çizelge 3.10. Hasta ve Kontrol grupları arasında birey sayıları ve genotip dağılım sıklıkları

Çizelge 3.11. Lys656Asn polimorfizminde hasta gruplarında AHI ve BMI'ya göre ayrılmış alt grupların genetik modellerle karşılaştırılması

Çizelge 3.12. Lys656Asn polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin kodominant modelde karşılaştırılması

Çizelge 3.13. Lys656Asn polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin dominant modelde karşılaştırılması.

Çizelge 3.14. Lys656Asn polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin resesif modelde karşılaştırılması.

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. LEPR geninin şematik görünümü.

Şekil 1.2. HIF-1 'in yapısı.

Şekil 1.3. HIF-1 α geninde görülen varyantlar.

Şekil 1.4. HIF-1 'in oksijen-bağımlı regülasyonu.

Şekil 1.5. Normoksi ve Hipoksi koşullarında HIF-1 α geni

Şekil 1.6. Tamir edilmemiş glukoz homeostazı ve adiposit bozukluğunda HIF-1 α 'nın rolü

Şekil 1.7. Leptinin uyardığı sinyal yolları

Şekil 3.1. Pro582Ser Polimorfizminin ARMS-PZR Sonucu

Şekil 3.2. Pro582Ser polimorfizminin dizi analizi sonucu

Şekil 3.3. Lys109Arg Polimorfizmininin PZR Sonucu

Şekil 3.4. Lys109Asn Polimorfizmininin RFLP Sonucu

Şekil 3.5. Lys656Asn Polimorfizmininin PZR Sonucu

Şekil 3.6. Lys656Asn Polimorfizmininin RFLP Sonucu

1. GİRİŞ

Uyku, hayatımızın üçte birini geçirdiğimiz ve sağlıklı yaşam için vazgeçilmez olan bir olgudur. Kimilerine göre sadece dinlenme olarak görülen uyku Aristo, Hipokrat, Freud gibi pek çok düşünür ve bilim adamı için gizemli bir süreç olarak yorumlanmış ve pek çok çalışmaya konu olmuştur. Bu süreçte uykunun bazı uyaranlar ile geri döndürülebilir bir bilinçsizlik hali olduğu bildirilmiş ve bu konudaki ilk gelişme Luigi Galvani'nin yaptığı hayvan deneylerinde, beyin hücrelerinde elektriksel aktiviteyi göstermesi, bunu takiben Richard Caton tarafından EEG'yi oluşturan potansiyellerin keşfi ile hız kazanmıştır (Köktürk 1998). Teknolojinin de gelişimi ile bu alanda bilgi birikimleri sonucu 1972 yılında ilk Uluslararası Uyku Apne Sendromu Sempozyumu düzenlenmiştir. Bilgi birikimlerinin artmasıyla Uyku Apne Sendromunun günümüzdeki tanımı 1973 yılında Christian Guilleminault tarafından yapılmıştır (Pack 1994). 2005 yılında yeni bir sınıflama hazırlanarak Uyku Bozuklukları Sınıflaması-2 (ICSD-2) yayınlamıştır.

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

Guilleminault ve ark (1973), çalışmalarında apnenin tanımını (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 kardiyak 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 kardiyak aritmi, hipertansiyon, hipoksi ile ilişkili hastalıklar,

miyokardial iskemi ve infeksiyon, serebrovasküler kazalar ve ani ölümlerin incelendiği birçok çalışma takip etmiştir.

1.2.1. Genel Özellikler

Obstruktif uyku apne/hipoapne sendromu (OSAHS) solunumla ilgili uyku bozuklukları içinde incelenen, birçok vücut sistemini ilgilendiren önemli bir sağlık sorunu olup erişkin dönemdeki en yaygın uykusuzluk (insomnia) nedenidir (A report of National Commission on Sleep Disorders Research 1995, Young ve ark 2002). Gerek uyku fizyolojisinin gerekse uyku apnesinin anlaşılmasında son 30-50 yılda önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Uykunun bilimsel olarak incelenmesinde önemli dönüm noktaları: 1950'lerde REM (rapid eye movement: hızlı göz hareketi) döneminin tanımlanması; 1960'larda üst havayolunda tıkanma ile uyku bozukluğunun ilişkilendirilmesi; 1970'lerde uyku apne sendromunun tanımlanması, 1980'lerde uyku apne sendromunun tedavisinde çığır açıcı bir gelişme olan basınç tedavisinin keşfedilmesidir (Demir ve Şahin 2004).

OSAHS, uykuda üst havayolunda tekrarlayan tıkanıklıklar nedeniyle oksijen desaturasyonu ve uyanma dönemleri olarak tanımlanmıştır. Uykuda kısa süreli solunum durması (apne) veya solunum azalması (hipopne) tek başına hastalık tanısı için yeterli değildir. Obstruktif uyku apne sendromu tanısı, apne-hipopne indeksinin (AHI: uykuda saat başına düşen toplam apne ve hipopne sayısı) 5 veya üstünde olması ile gündüz uykulu olma veya aşağıda sıralanan şikayetlerden en az ikisinin varlığında konur:

- i. uyku sırasında boğulur gibi olma,
- ii. uykudan sık uyanma,
- iii. dinlendirici olmayan uyku, gündüz yorgunluk, konsantrasyon güçlüğü gibi bilişsel bozukluk (The report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force 1999).

Apne ve hipopne en az 10 saniye süresince sırasıyla solunumun durması ve azalması olarak tanımlanmıştır. Hastalık tanısı için seçilen eşik apne-hipopne indeksi (AHI) değeri olan 5 rakamı epidemiyolojik araştırmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. İzlem araştırmalarında AHI'si 5 ve üstünde olan hastalarda gündüz uykululuk, hipertansiyon ve motorlu araç kaza riskinin artış gösterdiği görülmüştür (Fleetham 2004). Hastalık derecesi sınıflandırılırken de AHI'den yararlanılmıştır. Hastalık şiddetini belirlemede kabul edilen AHI düzeyleri hafif düzey için 5-14, orta düzey için 15-30, ağır düzey için ise >30 şeklindedir (The report of an American Academy

of Sleep Medicine Task Force 1999). İlk hastalık tanımlarında apne üzerinde durulurken hipopnenin de apneye benzer şekilde oksijen saturasyonunda düşme (desaturasyon) ve uyanmaya neden olduğu gösterilmiş ve OSAHS tanımına hipopne de eklenmiştir (Meoli ve ark 2001). Literatürde OSAHS’la eşdeğer şekilde kullanılan ‘Obstrüktif uyku apne hipopne sendromu’ veya ‘uyku apne hipopne sendromu’ tanımlarına rastlanılabilir. Üst havayolunda direnç artışı sonucu apne-hipopne olmaksızın uyanma oluşması gece boyunca sık uyku kesilmelerine ve klinik olarak OSAHS benzeri sonuçlara yol açabilir (Guilleminault ve ark 1993).

1.2.2. Epidemiyoloji

Prevalans oranları hastalığı tanımlamak için kullanılan ölçütlere göre değişmektedir. Çalışmalarda tanım olarak apne hipopne indeksi (AHI) $AHI \geq 5$ alındığında OSAHS prevalansı erkeklerde %24, kadınlarda %9 olarak bildirilmektedir (Young ve ark 1993). Obstrüktif uyku apne/hipoapne sendromu çeşitli yaş gruplarını etkileyebilir. Amerikalı yetişkinlerde OSAHS görülme sıklığı 30-60 yaş arası erkeklerde %4 ve kadınlarda %2 olarak rapor edilmiştir. daha Orta yaş yetişkinlerde erkeklerin %82’sine kadınların %93’üne klinik olarak tanı konulmadığı tahmin edilmektedir (Young ve ark 1993). Köktürk ve ark (1997) tarafından Türkiyede yapılan bir araştırmada ise OSAHS prevalansı %0,9-1,9 olarak saptanmıştır. İleri yaş döneminde (65 yaş ve üstü) hastalık prevalansının arttığı tahmin edilmektedir (Partinen ve ark 1998).

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 menopoza sonrası hastalık riski menopoza öncesinden daha yüksek görülmektedir (Silke ve Sean 2007).

Yaş ve cinsiyetin haricinde obezite, horlama, ırk, ilaçlar, kraniofasial anatomi, nasal obstrüksiyon, ailesel ve genetik faktörler de OSAHS’ın gelişme riskini artırabilir. Avrupalılar ile Maori ve Pasifik adalarında yaşayanlar arasında yapılan bir çalışmada 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 ve ark 2005). Hipertansiyonlu hastalarda yapılan çalışmalarla OSAHS'ın sıklığının % 26-49, kontrol gruplarında ise % 0-12 oranında olduğu belirlenmiştir (Houwelingen 1999).

1.2.3. Etiyoloji

OSAHS çok sayıda gen, 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. Diğer risk faktörleri arasında boyun yapısı, yumuşak damak gelişimi, yaş, ilaçlar, çevresel etkiler ve genetik faktörler sayılabilir.

1.2.4. Klinik Özellikler

OSAHS solunum çabası devam etmesine rağmen tam (apne) veya kısmi (hipoapne) kesilme ile sonuçlanarak uyku süresince faringeal 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, baş ağrısı, göğüs ağrısı, cinsel yetersizlik, konsantrasyon ve hafıza kayıpları, kişilik değişiklikleri ya da depresyon olabilir (Houwelingen 1999).

OSAHS kesin tanısı için altın standart tanı yöntemi olarak uyku laboratuvarlarında kullanılan Polisomnografi (PSG) testinin yapılması gerekir (Houwelingen 1999).

1.2.5. Polisomnografi (PSG)

Kesin tanısı konulacak hastaya, uyku süresince durumunu gözleyebilmek için bir gece uyku laboratuvarında polisomnografi testi uygulanır. 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 5-14 arası hafif dereceli, 15-30 arası orta dereceli, 30 ve daha yukarısı ağır dereceli OSAHS olarak tanımlanır (Sousa ve ark 2008).

1.3. Obezite, Leptin, Leptin Reseptörü

1.3.1. Obezite

Obezite, OSAHS için en büyük risk faktörlerinden birisidir (Redline ve Tishler 2000, Hiestand ve ark 2006). Klinikte görülen obez hastaların %50-77'sinde OSAHS saptandığı bildirilmiştir (Vgontzas ve ark 1994). Obstrüktif uyku apne sendromlu olguların ise %70'inde obezite görülmektedir (Göçmen ve Karadağ 2007).

Obez ve obez olmayan bireyleri ayırmada; vücut ağırlığının (kg), boy uzunluğunun (m) karesine bölünmesi ile elde edilen vücut kitle indeksi (Body Mass Index: BMI) yaygın olarak kullanılır. BMI; 25,0-29,9 arası olanlar aşırı kilolu 30,0 ve daha yukarı olanlar ise obez olarak tanımlanmıştır (Marik 2000). BMI, OSAHS insidansı ve şiddetiyle direkt olarak ilişkilidir (Lopez 2008).

Obezite, boyun ve özellikle farenks çevresinde adipoz dokunun artmasıyla üst hava yolunu daraltmaktadır (Schwab ve ark 1995). Obezlerde üst hava yolu kapanma eğiliminin arttığı gösterilmiştir (Schwartz ve ark 1991). Özellikle santral obezite ile vital kapasitenin azalması, farenks üzerinde aşağı doğru genişletici kuvveti de azaltarak farenksin kapanabilirliğini arttırmaktadır (Demir 2007). Amerikada yapılan NHANES araştırması 1960'lı yıllardan 2000'li yıllara, 20-74 yaş grubu erişkinlerde BMI'nin ortalama 25 kg/m²'den 28 kg/m²'ye çıktığını göstermiştir (Zhang ve ark

2009). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre ise 2015 yılı içinde dünya nüfusunun yaklaşık %10'unun obez olacağı tahmin edilmektedir (McClean ve ark 2008). Obezite metabolik sendromun bir komponenti olarak kardiyovasküler hastalıklar için bilinen en önemli risk faktörlerinden biridir. OSAHS'da da apneler sırasında kapalı hava yoluna karşı inspirasyon yapılmaya çalışılması sonucu oluşan intratorasik negatif basınç, hipoksemi, hiperkapni ve sık tekrarlayan arousallar ile otonom sinir sisteminin uyarılması, kardiyovasküler komplikasyonlara neden olmaktadır (Guilleminault ve ark 1993, Young ve ark 2002). Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl uykuda solunum bozukluğunun kardiyovasküler komplikasyonları ile 38.000 kişinin öldüğü ve 42 milyon dolarlık hastaneye yatış maliyetinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir.

Ciddi obez hastalar ventilasyon-perfüzyon uyumsuzluğuna sebep olan genişlemiş alveolar-arteriel oksijen değişimi ile sık sık hipoksemiktir. Dahası obezite pulmoner tromboembolizm için büyük bir risktir. Obezitenin etiyojisi uzun bir periyod 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 (Marik 2000). Obezite, düşük leptin seviyelerinden daha çok yüksek leptin seviyeleri ile karakterizedir. Bu durum obez insanlarda leptin direncinin olduğunu düşündürmektedir (Considine ve ark 1996). Birçok mekanizma leptin direnci ile ilgili olabilir. Mutant leptin reseptörüne bağlı azalmış leptin reseptör sinyalizasyonu bu durumun açıklamalarından biri olabilir (Schwartz ve ark 2005).

1.3.2. Leptin

Adipoz dokunun sadece lipidlerin depo edildiği bir yer olmadığı, aynı zamanda bir faktör salgılayarak vücut ağırlığını kontrol edebileceği fikri ilk kez 1953 yılında ortaya atılmıştır (Tritos ve Mantzoros 1997). Zhang ve ark (1994) tarafından obezitenin tipik fenotipinden sorumlu obezite geninin (ob/ob) bulunduğu bildirilmiştir. Ob geni sitokinlere benzeyen, 167 aminoasit içeren, 16 kilodalton ağırlığında olan ve adını Yunanca leptos (ince) kelimesinden alan bir protein olan leptin hormonunu sentezler (Tritos ve Mantzoros 1997). Obezitenin patogenezinin anlaşılmasındaki başlıca ilerleme leptin hormonunun keşfidir. Leptin yapıcı

sitokinelere olan benzerlikleri nedeniyle, sitokin olarak da sınıflandırılabilir. Sıçanlarda 6 nolu kromozomda bulunan ob geni (Considine ve Caro 1997) insanlarda 7q31.3'de (7. kromozomun uzun kolunun 31.'ci bölgesi) lokalizedir (Green ve ark 1995). Bu genin iki intron tarafından ayrılmış üç ekzondan oluştuğu, bunlardan iki tanesinin (2. ve 3. ekzon) leptini kodlayan baz dizisini içerdiği gösterilmiştir (Considine ve Caro 1997). Bu baz dizisi 3.5 kb'lık bir mRNA kodlar ve translasyonla N terminalinde 21 aminoasitlik bir sinyal peptidi bulunan 167 aminoasitli prohormon sentezlenir (Brann ve ark 2002). Sirkulasyonda bu sinyal peptidi ayrılır, 146 aminoasitli ve 14-16 kDa ağırlığındaki leptin molekülü oluşur (Sandoval ve Davis 2003). İnsan leptini sıçan leptini ile %83, fare leptini ile %84 homoloji gösterir (Considine ve Caro 1997). Vücutta başlıca adipoz (yağ) dokuda sentezlenen leptinin az miktarda plasenta, gastrik epitelyum, iskelet kası, hipofiz ve meme bezi tarafından da salgılandığı gösterilmiştir (Bado ve ark 1998).

Leptin enerji dengesine oldukça duyarlıdır; diyet ve fiziksel aktivite leptin konsantrasyonunu etkilemektedir. Vücut yağ dokusu miktarı arttıkça leptin miktarı da artar. Obezlerde normale göre yaklaşık iki misli daha fazla leptin düzeyi vardır ve kan leptin miktarı vücut yağ kitlesiyle korelasyon gösterir. Vücut ağırlığındaki küçük değişiklikler serum leptin düzeyinde büyük değişikliklere yol açmaktadır. Obez insanlarda vücut ağırlığında %10'luk bir azalma ile serum leptin düzeyinde %53'lük bir azalma, ve vücut ağırlığında %10'luk bir artış ile ise serum leptin düzeyinde %300'lük bir artış görülür (Considine ve ark 1996).

Leptinin vücuttaki başlıca rolü, gıda alınımı ve enerji metabolizmasını düzenlemek ve obezite gelişmesini engellemektir. Ayrıca, metabolizmanın düzenlenmesi, cinsel gelişim, üreme, hematopoez, immünite, gastrointestinal fonksiyonların düzenlenmesi, sempatik sinir sistemi aktivasyonu, angiogenez ve osteogenezde de çok önemli rolleri olduğu saptanmıştır. Leptin eksikliği veya direnç durumları insanda obezite, diyabet ve infertilite ile sonuçlanmaktadır (Hekimoğlu 2006).

Leptin lipid oksidasyonunu arttırması ile birlikte yağ asidi ve trigliserit sentezini azaltarak intraselüler lipid artışını engeller. Lipid metabolizmasına etkisi, yağ asidi sentezinde enzim hızını sınırlayarak, asetil CoA karboksilaz aktivitesini engelleyen bir etki olabilir (Marik 2000). Leptin regülasyonunun incelenmesinde bazal leptin ve plazma leptin düzeyindeki değişikliklere etki eden genetik ve çevresel faktörlerin anlaşılması önem taşır.

1.3.3. Leptin Reseptörü (LEPR)

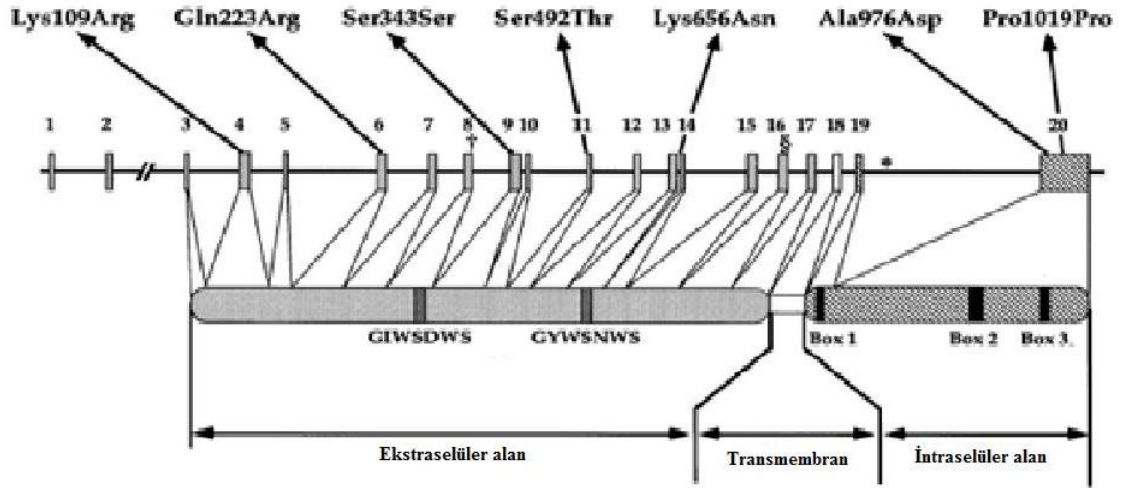
Tartaglia ve ark (1995), leptin reseptörlerinin yapısını ve yerleşimini tanımlamışlardır. Leptin reseptörü, sitozolik transkripsiyon aktivatörü (STAT) proteinlerinin aktivasyonu yoluyla gen transkripsiyonunu uyardığı bilinen gp130 sitokin reseptör ailesinin bir üyesidir (OMIM 2009). Leptin reseptörü OB-Rb (uzun reseptör) ve OB-Ra (kısa reseptör) olarak 2 alternatif kırılma (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 kapıllarıdır. 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 (Şekil 1.1.). LEPR reseptörü protein yapısına göre hücre dışı, transmembran ve hücre içi bölgelerden oluşur. LEPR geninde birkaç fonksiyonel önemli domain vardır. Hücre dışı bölgede ligand bağlanmasını sağlayan iki sitokin motifi (GXWSXWS) içerir. Hücre içi bölge hipotalamusta STAT ve Janus-aktive kinazla (JAK) etkileşen diziler bulundurur (Matsuoka 1997, Yong-Jun ve ark 2003).

1.3.4. Leptin Reseptör Gen Polimorfizmleri

Evrin 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: kısa DNA baz tekrarları (mikrosatellit), uzun DNA baz tekrarları (VNTR), DNA'nın tek bir bazındaki değişiklikler (SNP).

LEPR genine ait OB-Rb gen yapısında 7 varyant bulunur. Bu tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) Şekil 1.1.'de verilmiştir.



Şekil 1.1. LEPR geninin şematik görünümü. LEPR'deki tek nükleotid polimorfizmleri; ekzon 4'de 329. nükleotid de A→G (Lys109Arg), ekzon 6'da 668. nükleotitte A→G (Gln223Arg=Q223R), ekzon 9'da 1029. nükleotitte T→C (Ser343Ser), ekzon 11'de 1475. nükleotitte G→C (Ser492Thr), ekzon 14'de 1968. nükleotitte G→C (Lys656Asn), ekzon 20'de C→A (Ala976Asp), G→A(Pro1019Pro) transisyon ve transversiyonları görülür (Matsuoka 1997).

1.4. Hipoksi ve Hipoksi İndüklenebilir Faktör-1α (HIF-1α) Geni

1.4.1. Hipoksi ve OSAHS İlişkisi

Hipoksi; oksijen verimi veya oksijen varlığının azalmasına yol açan nedenlerden kaynaklanır. Sürekli veya aralıklı olarak ve zamanla akut ya da kronik olarak ortaya çıkabilir. Kronik sürekli hipoksi fizyolojik ve patolojik durumda meydana gelirken, kronik aralıklı hipoksi yalnızca patolojik durumda meydana gelir (Semenza 2009). Vücut içinde parsiyel oksijen basıncı (PO₂) seviyeleri, üst hava yolunda 150 mm Hg'dan, retinada 5mm Hg'ye kadar düşer (Taylor 2008). Oksijen homeostazının korunması kompleks bir olaydır; hormonal, otokrin ve nöronal mekanizmalar arasındaki ilişkiyi gerektirir. Bu faktörlerde meydana gelecek bir dengesizlik, patolojik süreçleri beraberinde getirir ve hipoksi ile ilişkili hastalıklara yol açar. Günümüzdeki çalışmalar metabolik sorunların OSAHS'la ilişkili hipoksik stresle bağlantılı olduğunu göstermektedir (Jianguo ve ark 2006).

1.4.2. İntermittent (Aralıklı) Hipoksi

İntermittent (Aralıklı) Hipoksi, 15-30 sn'lik kısa süreli hipoksinin ardından, daha uzun süreli (örn 5 dak) yeniden oksijenlenme periyotlarından oluşur. İntermittent hipoksinin bir fare modelinde OSAHS ve metabolik sendrom arasındaki ilişki değerlendirilmiştir (Polotsky ve ark 2003, Li ve ark 2005a, 2005b). 5 gün boyunca intermittent hipoksiye maruz bırakılan farelerde hiperkolesterolemi ve

hipertrigliseritemi görülmüştür (Li ve ark 2005a). İntermittent hipoksi, lipid biyosentezinin anahtar bir transkripsiyon faktörü olan sterol düzenleyici element bağlama proteini (SREBP)-1 tarafından karaciğerde trigliserit biyosentezini artırır (Shimano ve ark 1999, Horton ve ark 2002, Li ve ark 2005). İntermittent hipoksinin, HIF-1'in lipid biyosentezini arttıran SREBP-1 yolağını düzenleyerek uyardığı düşünülmektedir (Cai ve ark 2003, Yuan ve ark 2005).

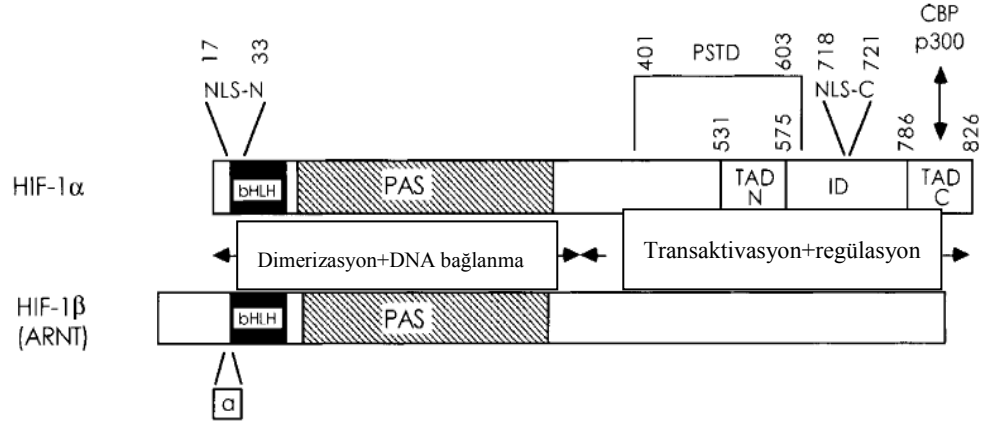
1.4.3. Kronik İntermittent Hipoksi

Hipoksemiye yol açarak solunumun kesilmesi ve hava yolunu tıkaması ile sonuçlanan, sonrasında soluk alıp verme için bireyin uyarıldığı OSAHS'lı hastalarda görülür. Li ve ark (2006) 'nın yaptığı bir çalışmada, OSAHS'ın kronik intermittent hipoksiyle tanımlandığını, lipid metabolizması ve aterosklerozun düzensizliği ile ilişkili olduğunu söylemişlerdir. Ayrıca, obezitenin varlığında kronik intermittent hipoksinin hiperkolesterolemi ve lipid peroksidasyonuna yol açtığını ortaya koymuşlardır. Hem hipoksemi (kanın eksik oksijenlenmesi) hem de hiperkapni (kanda karbondioksit fazlalığı) nöronal refleks mekanizmaları aracılığıyla çeşitli kardiyovasküler etkilere sahiptirler (Xie ve ark 2000). Bundan dolayı, hipoksinin uyku apnesinde kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Kronik intermittent hipoksi ayrıca sistemik hipertansiyonla uyandırır, OSAS'ın sistemik hipertansiyonlu bireylerin %30'unda arttırıcı etki yaptığı düşünülmektedir (Laughner 2001). Ayrıca, rodentlerde ve insanlarda ROS üretimini ve HIF-1 α ekspresyonunu da uyarır (Dyugovskaya ve ark 2002, Peng ve ark 2006, Prabhakar ve ark 2007).

1.4.4. Hipoksi İndüklenebilir Faktör-1 α (HIF-1 α) Geni

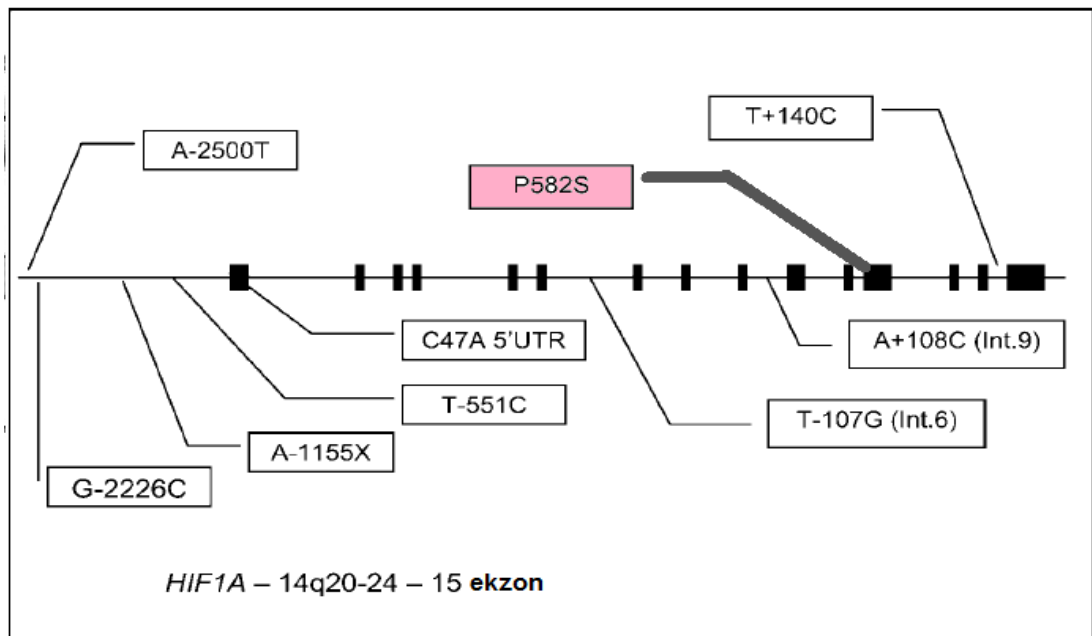
HIF'in tanımlanması, eritropoietinlerde kronik hipoksinin çarpıcı etki mekanizmalarının araştırılmasına dayanır. Eritropoietin (EPO) geninin 3'enhansır bölgesinde DNA-protein etkileşimlerini kullanarak yalnızca hipoksik koşullar boyunca kısıtlanan bir protein kompleksi keşfedildi. Bu protein kompleksine bağlanarak EPO geninin transkripsiyonunun artmasına ve sonuç olarak EPO üretiminde artışa neden olmuştur. Bu kompleks daha sonraları Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 (HIF-1) olarak isimlendirildi (Semenza ve ark 1991). Hipoksiye hücrel yanıt çok aşamalı bir süreçtir ve transkripsiyonel yanıtların çoğu HIF'ler tarafından düzenlenir. Bu HIF gen ailesinin ana elemanları hipoksi ile indüklenen genlerin ifadenmesini aktive eden HIF-1 α geni ve diğeri HIF-1 α proteini ile heterodimer oluşturan aryl hidrokarbon reseptör nükleer translokator (ARNT)

proteininin sentezinden sorumlu HIF-1 β genidir. Bu heterodimer yapı PAS (Per-Arnt-Sim) ailesinin temel heliks-loop-heliks (bHLH) proteinleridir (Şekil 1.2.). (Kelsey 1993, Park ve ark 2003, Yamada ve ark 2005, Ke ve Costa 2006).



Şekil 1.2. HIF-1 'in yapısı (Semenza 2009).

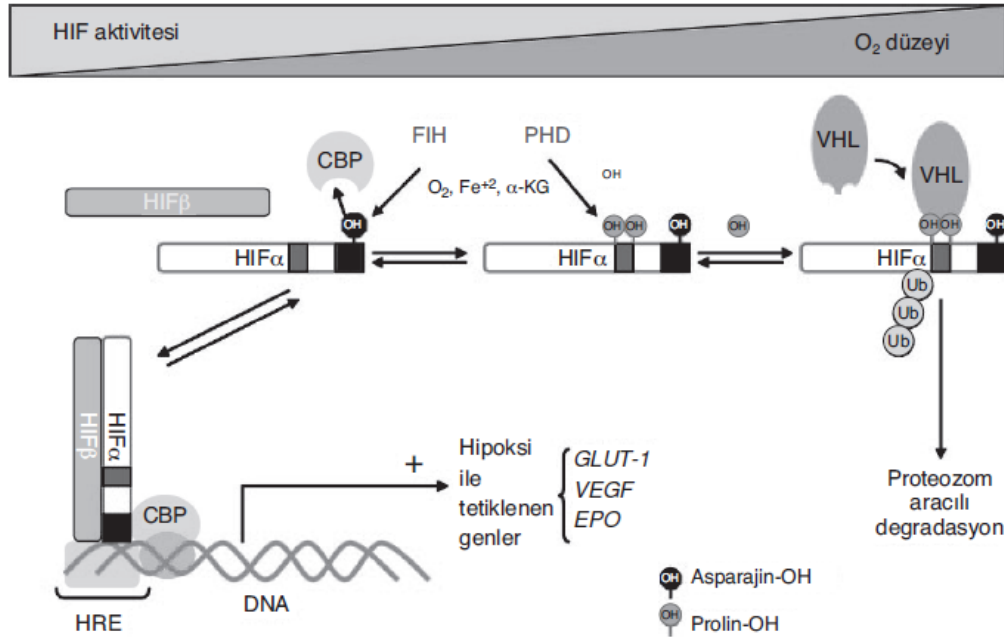
HIF-1 α , HIF-1'in varlığını saptadığı ve hipoksi ile indüklenen genleri aktive ettiği için ana proteindir (Yamada ve ark 2005). HIF-1 α ; kromozom 14q20-24'de bulunan, 15 ekzon ve 14 introndan oluşan bir gendir. Bu gen yapısında 3'ü yaygın 6'sı nadir olmak üzere toplam 9 varyant bulunmaktadır. Bunlardan exon 12'de 85. nükleotitde görülen C→T değişikliği, proteinin aminoasit dizisinde prolinin serine dönüşümüyle sonuçlanır (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. HIF1- α geninde görülen varyantlar (Prior ve ark 2003).

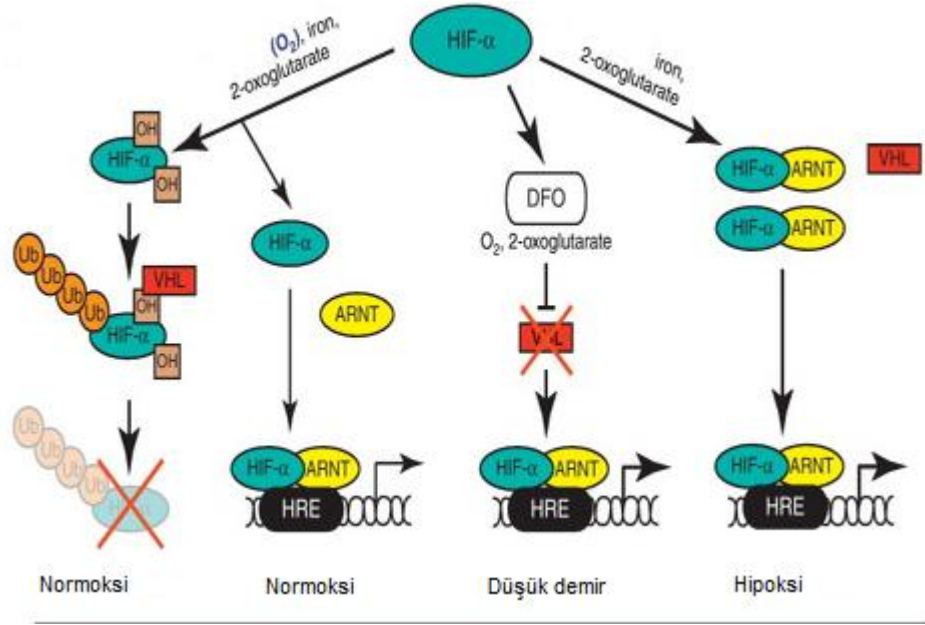
HIF-1 β , oksijene yanıt oluşturmaz; fakat fonksiyonel HIF kompleksinin oluşumu için gereklidir. HIF α / β heterodimerleri; 5'-RCGTG-3' merkezi nükleotid sekansı ile hedef genin güçlendirici ya da promotorunda bir DNA bağlanma motifi olan hipoksi yanıt elementleri (HRE) zerindeki hedef genlere bağlanır (Semenza 1992). HIF-1 proteinleri hücre ve dokularda düşük oksijen basıncına adaptasyon hücre sağ kalımı ve çoğalması, anjiyogenez, eritropoez, glikoz alınımlı ve demir metabolizması gibi proseslere bağlı birçok genin hipoksiye transkripsiyonel aktivasyon cevaplarının anahtar düzenleyicisidir.

HIF-1 α normoksik koşullar altında, oksijen bağımlı prolin hidroksilaz proteinleri (PHD) tarafından, oksijen bağımlı degregasyon domaini (ODD) prolin 402 ve 564 bölgesine hidroksillenir. Hidroksillenen HIF-1 α alt üniteleri sonraki degradasyonlar için E3 biktin ligaz kompleksinin bir parçası olan VHL proteininin hedefidir. Bunun dışında HIF-1 α 'nın normoksik modifikasyonları onun transkripsiyonel aktivasyonunu da etkileyebilir. HIF-1 α 'nın C-terminal transaktivasyon domeynine asparajin 803 üzerindeki hidroksilasyon, faktör inhibe edici HIF-1 (FIH) tarafından normoksida katalizlenir (Jessica and Karen 2011). Bu hidroksilasyon ile HIF-1 α 'nın CBR (CREB bağlanma proteini) ve P300 transkripsiyonel ko-aktivatörler ile etkileşimleri FIH tarafından baskılanarak regüle edilir (Hewitson ve ark 2002, Lando ve ark 2002). (şekil 1.4). FIH sitoplazmada lokalize olmakla birlikte bazı fraksiyonları için çekirdekte de bulunabilir. FIH transkripsiyonu oksijen konsantrasyonundan bağımsızdır ve HIF-1 α stabilitesini etkilemez (Metzen ve ark 2003).



Şekil 1.4. HIF-1'in oksijen-bağımlı regülasyonu. Normaksida (sağ taraf), HIF-1 α nın iki prolin resüdü (P⁴⁰² ve P⁵⁶⁴) ve asparajin (N⁸⁰³) sırasıyla PHD ve FIH'la O₂, 2-OG ve Fe²⁺ ye bağımlı şekilde hidroksilize edilir. Hidroksillenmiş HIF-1 α VHL proteini için bağlanacak bir yer oluşturur ve bu şekilde HIF-1 α 'nın ubiquitinasyonu ve proteozom aracılı yıkımı tetiklenir. Hipoksi durumunda (sol taraf) PHD ve FIH aktiviteleri baskılanarak prolin ve asparajinlerin hidroksilasyonu ortadan kalkar, ve VHL bağlanması olmaz. Bu durumda hidroksillenmemiş HIF-1 α 'nın CBP bağımlı p300 proteinlerine yönlendirilmesine, fosfatlanmasına ve HIF-1 α stabilizasyonuna yol açılır. Stabilleşen ve biriken HIF-1 α proteinleri çekirdeğe transloke olur, HIF-1 β 'ye bağlanır. Oluşan heterodimer DNA'nın hipoksi ile regüle olan element (HRE) sekanslarına bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar (Benarroch 2009).

Hipoksik koşullarda ne PHD'ler ne de FIH fonksiyoneldir. HIF- α proteazomal yıkımdan kaçır, sitozolde birikir, stabil hale gelir, fosforillenir ve nükleusa geçerek HIF- β ile heterodimerik bir kompleks oluşturur. Bu kompleks hipoksiyle indüklenebilen genlerin promotor ya da güçlendirici DNA sekanslarına bağlanır. HRE'lere HIF bağlanması sonucu hedef genlerin transkripsiyonu başlar (Lee ve ark 2004, Maynard ve Ohh 2005) (Şekil 1.5.). Hipoksiye ek olarak, TNF- α ve interlekin 1 β gibi proinflatuar sitokinler de HIF ifadesini tetikleyebilir (Rabie ve Marti 2008).

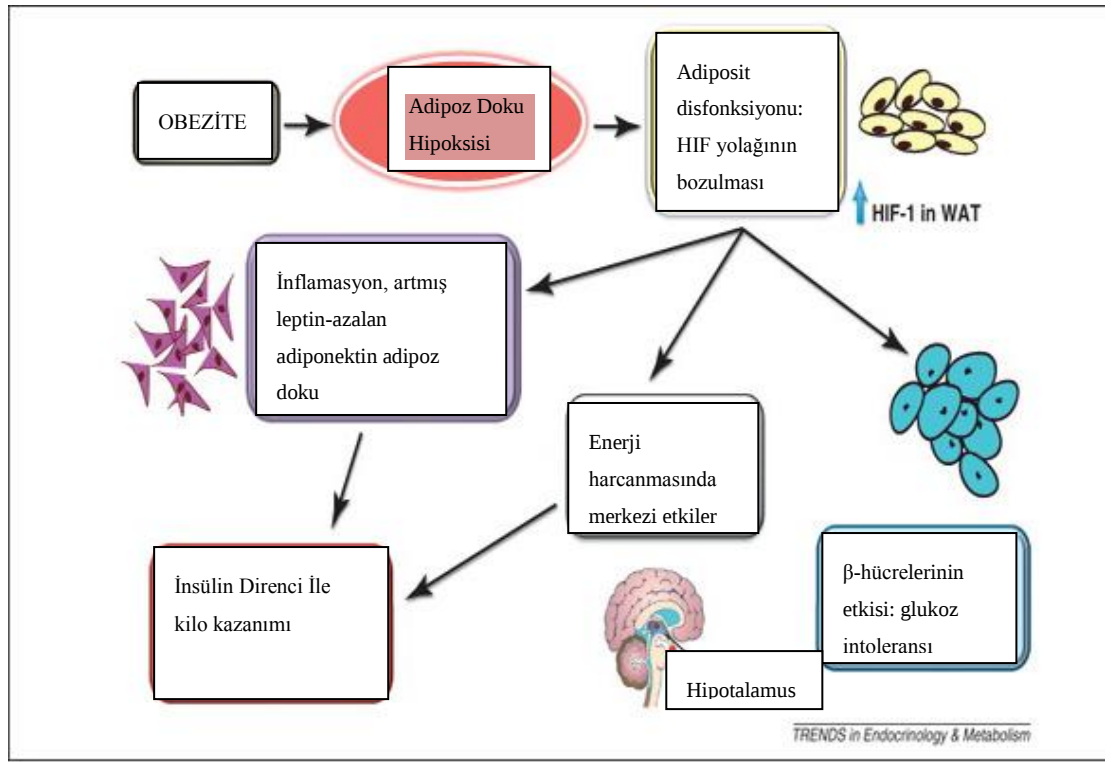


Şekil 1.5. Normoksi ve Hipoksi koşullarında HIF-1 α geni (Girgis ve ark 2012).

1.4.5. HIF-1 α 'nın Hedef Genleri

Hücre ve organlar oksijen basıncındaki değişikliklere uyum sağlama ihtiyacındadırlar. HIF-1 hedef genlerinin bulundukları dokuya oksijen sağlanmasındaki değişimlere söz konusu dokuya özel bir şekilde adaptasyon göstermesi sürpriz olmamalıdır. Halen HIF-1'in adaptasyonu ile regüle edilen farklı fonksiyonlu 100 den fazla gen bulunmuştur. HIF-1 güçlendirici ve promotör bölgelerinde lokalize olmuş 50 baz çiftli bir cis-acting HRE bölgesine bağlanarak bu genlerin ifadesini aktive eder (Semenza ve ark 1991). Dahası arteriyel endotel hücrelerinde, insan genlerinin %2'den fazlasının, direkt veya indirekt olarak HIF-1 tarafından regüle edildiği bildirilmiştir (Manola ve ark 2005, Koukourakis ve ark 2006, Semenza 2009).

1.5. Obezite, HIF-1 α Geni ve Leptin Arasındaki Bağlantılar



Şekil 1.6. Tamir edilmemiş glukoz homeostazı ve adiposit bozukluğunda HIF-1 α 'nın rolü. Obez bireylerdeki, adipoz doku hipoksisi inflamasyon ve makrofaj infiltrasyonunu içeren adipositlerdeki HIF-1 α 'nın disregülasyonu bir dizi olaylar zincirini başlatır (Girgis ve ark 2012).

Leptin, keşfinden beri adipoz dokunun adipokinleri üreten dinamik bir organı olduğu bilinir. Adipoz doku, enerji dengesinde, glukoz metabolizmasında, inflamasyonda ve bağışıklıkta belirli rollere sahiptir (Trayhurn 2001, Sell 2006). Kültüre edilmiş adiposit ve preadipositlerde, HIF-1 α ekspresyonunun; hipoksiye ve kobalt (II) kloride, inflamatuvar mediatör olan IL-6'nın artan seviyesine ve monosit göç-inhibitör faktöre maruz kalınması sonucunda, yüksek leptin ve azalan adiponektin seviyeleri tarafından düzenlendiği bilinir (Wang ve ark 2007).

Obez bireylerde, abdominal yağ dokusu içinde azalan oksijen basıncı büyük makrofaj filtrelemesiyle ilişkilidir (Pasarica 2009). Adipoz doku hipoksisinin zararının ve hipoksiye adiposit cevap defektlerinin çeşitli hastalıkların patogenezeine katkı sağladığı gösterilmiştir.

1.6. Leptinin Uyardığı Sinyal Yolakları ve HIF-1 α Bağlantısı

Leptin, onkogenler, sitokinler ve büyüme faktörleriyle karmaşık bir etkileşim içersindedir. Leptin ile uyarılmış sinyaller birçok sitokin tarafından yaygın olarak çeşitli yolakları tetikler. Bunlardan JAK2/STAT; MAPK/ERK1/2 ve PI3K/AKT1

sinyal yolaklarını tetiklediği kesinleşmiş olmakla beraber; PKC, JNK ve p38 henüz kesinleşmemiştir. Leptin ile uyarılmış sinyallerin her birinin, besin alımı üzerindeki biyolojik etkilerine, enerji dengesine, adiposite, immun ve endokrin sistemlere ve ayrıca onkogenlere etkisi önemlidir. Leptin reseptör izoformları arasında, yalnızca Ob-Ra, tam bir hücre içi domain içerir ve ligand bağlanmasında hücre içi JAK-STAT yolağını aktive eder ve sırasıyla Ob-Ra fosforilleyen JAK'ları kuvvetlendirip konformasyonel değişiklikleri uyarır (Guo ve ark 2012) (şekil 1.7.). Leptin ve HIF-1 α arasındaki ilişki çift yönlüdür. HIF'ler çeşitli hücre tiplerinde leptin sinyalini artırabilir. Ayrıca, HIF/p300 kompleksinin leptin transkripsiyonuna karıştığı, majör HIF koaktivatörü olan p300'ün güçlenmesi ve leptin promotörü üzerinde HIF-1 α 'ya katılmasının aynı anda olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan, leptin de HIF-1 α 'yı uyarabilir. Leptinin VEGF (vasküler endotelial growth factor) promotörüne etki ederek HIF-1 α 'nın DNA bağlanma aktivitesini arttığı gösterilmiştir (Gonzalez ve ark 2010).

Şekil 1.7. Leptinin uyardığı sinyal yolları (Guo ve ark 2012).

1.7. Amaç

OSAHS solunum çabası devam etmesine rağmen tam (apne) veya kısmi (hipoapne) kesilmelerle uyku süresince farengial hava yolunda tekrar eden tıkanmalarla karakterizedir. Obezite ve erkek cinsiyeti, OSAHS için belirlenmiş en yaygın risk faktörleridir. 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 hem de 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).

İnsan genomunda en çok bulunan genetik çeşitlilik tipi, tek nükleotit polimorfizmleridir (SNP). Bu çalışmada ilk önce LEPR'lerinden Ekzon 4'de 326.nükleotidinde (kodon 109) A→G dönüşümü gerçekleşen Lys109Arg polimorfizmi ve Ekzon 14'de 1968. nükleotidinde G→C dönüşümü gerçekleşen Lys656Asn polimorfizminin OSAHS'la ilişkili olup olmadığını RFLP metodu kullanarak Konya popülasyonunda değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Kronik intermittent hipoksi, OSAHS'ın sık görülen bir özelliğidir. Kronik intermittent hipoksi ve reoksijenasyona hücrel yanıt, OSAHS'ın patofizyolojik sinyal yollarının iç yüzünü anlamamızı sağlayabilir. CIH, oksidatif strese kas duyarlılığını değiştirebilir. Hipoksik koşullar altında oksijen homeostazını düzenleyen transkripsiyon faktörü HIF-1α'dır. Günümüzdeki çalışmalar 100'den fazla genin transkripsiyonunu düzenlediği bilinen HIF-1α geninin leptinle olan ilişkisini ortaya koymuştur (Shanchun ve ark 2012). Çünkü hipoksi leptinin ifadenmesini artırır. Yapılan bir çalışmada leptinin yeni bir hipoksi-indükleyici gen (HIF) olduğunu, HIF-1'in HRE bölgesi ile etkileşimi yoluyla leptinin uyarıldığını göstermiştir (Grosfeld ve ark 2002). Bu çalışmada HIF-1α'da meydana gelebilecek bir değişikliğin OSAHS'lı bireylerde hipoksi yanıtını değiştirebileceği düşüncesinden yola çıkılarak; HIF-1α'da yaygın olarak görülen Ekzon 12'de 85.nükleotidinde C→T dönüşümü gerçekleşen Pro582Ser polimorfizminin

OSAHS'la ilişkisinin olup olmadığı ARMS metodu kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

LEPR genindeki Lys109Arg polimorfizminde, G allelinin etkisi dominant (AA ve AG/GG) ve resesif (AA/AG ve GG), Lys656Asn polimorfizminde C allelinin etkisi dominant (GG ve GC/CC) ve resesif (GG/GC ve CC) ve HIF-1 α genindeki Pro582Ser polimorfizminde T allelinin etkisi dominant (CC ve CT/TT) ve resesif (CC/CT ve TT) 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) arasındaki ilişki çeşitli istatistiksel yöntemler kullanılarak açıklanmaya çalışılmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hasta Kabulü

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Uyku Laboratuvarına 2011 yılında başvuran erkek bireylerden horlama, tanıklı apne ve gündüz aşırı uyku hali şikâyetlerinin en az biri ya da üçü birlikte olanlar çalışmaya dahil edildi. Boyun ile bel çevresi ve kan basınçları ölçüldü. Gerekli görülenlerin hasta yatışı yapıldı ve rutin biyokimyasal parametreler (hemogram, glukoz, kolesterol, trigliserit, HDL, LDL... gibi) ve diğer tahlilleri (EKG, solunum fonksiyon testi, iki yönlü akciğer grafisi) yaptırmaları için yönlendirildi. Yatışı yapılan hastalar akşam 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. 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.

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

2.3. Uyku Çalışması

Kesin tanısı konulacak hastaya uyku süresince durumunu gözleyebilmek için bir gece uyku laboratuvarında polisomnografi testi uygulandı (VIASYS Healthcare GmbH, Hoeberg, Germany). Bu test oronazal hava akımı kaydı (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-A₁, C₃-A₂, O₂-A₁), oksijen saturasyon probu (pulse oksimetre), horlama sensörü'ne (mikrofon) ait parametreler kayıt edildi. Ayrıca gündüz aşırı uyku halini ölçmek için kullanılan ve subjektif bir test olan Epworth uykululuk skalasında 10 puan ve üzeri patolojik olarak değerlendirildi. Apne ≥ 10 sn hava akımındaki kesilme, hipoapne ≥ 10 sn süresince bazal hava akımındaki 50 % azalma ile birlikte 3% 'lük desaturasyon veya bir uyarılma 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 periferik kan alındı ve -20 °C' de depolandı.

2.5. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için klasik yöntem olan 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°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 °C de 3 saat inkübe edildi. 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°C de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerdeki süpernatant kısmı yeni steril falkon tüplere alındı. Her tüpün üzerine 3 ml Fenol: Kloroform: İzamil 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°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°C de soğutulmuş %95'lik etanol (EtOH) eklendi. Tüpler sert bir şekilde

sallanarak 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°C'de saklandı. DNA' ların kalitesi ve miktarını ölçmek için S.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Genetik Laboratuvarına 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.

2.5.1. İzolasyonda Kullanılan Çözeltiler

10x Lysis Buffer: 770 mM NH₄Cl, 46 mM KHCO₃, 10 mM EDTA

10X Lysis Buffer hazırlanışı: Mezür içerisine yukarıdaki konsantrasyonlarda miktarlar tartılarak konuldu. Önce 200–300 ml dH₂O içerisinde çözülür. EDTA' nın çözülmesi için pH=8 yapıldı. Daha sonra 1 litreye tamamlandı.

Salt Edta: 75 mM NaCl, 25 mM EDTA

Salt EDTA hazırlanışı: Mezür içerisine yukarıdaki konsantrasyonlarda miktarlar tartılarak konuldu. 200-300 ml dH₂O içerisinde çözüldü. EDTA' nın çözülmesi için pH=8 yapıldı. Daha sonra 1 litreye tamamlandı.

%10 SDS solüsyonu: SDS: 10 gr, dH₂O: 100ml

Hazırlanışı: 10 gr SDS tartıldı, 100 ml' ye tamamlandı. Çözülmesi için 68 °C de sıcak su banyosunda bekletildi.

10 mM Tris : (Tris MA: 121,4): 50 ml Tris için 0,060 gr tartıldı ve 50 ml ye tamamlandı.

Sodyum Asetat Çözeltisi: (NaAc MA: 136): 500 ml 3M NaAc çözeltisi için 204 gr tartıldı ve dH₂O ile 500 ml' ye tamamlandı. HCl ile pH= 5,2 'ye ayarlandı. +4 °C' de muhafaza edildi.

2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Genomik DNA'dan istenilen gen bölgesini çoğaltmak için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapıldı.

LEPR genindeki Lys109Arg polimorfizmine (rs1137100) ait primer çifti online (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) Primer3 veritabanında tasarlandı. Aşağıda verilen tüm primerler Metabion (Almanya) firmasına sentezlettiler.

İleri primer (Forward)

5'-AAC CTA TGA CTA CTT CCT TTT GCC-3' Tm: 62 °C

Geri primer (Reverse)

5'- AAA CTA AAG AAT TTA CTG TTG AAA CAA ATG GC-3' Tm: 65 °C

LEPR genindeki Lys656Asn polimorfizmine (rs:8179183) ait primer çifti Oksanen ve ark'ın (2000) yapmış olduğu çalışmada kullanılan primer çifti seçildi.

İleri primer (Forward)

5'- CAA CTT GTC ATT TTG CAG TTC C-3' Tm: 65 °C

Geri primer (Reverse)

5'- CTT CCA AAG TAA AGT GAC ATT TTT CGC-3' Tm: 67°C

HIF-1 α Genine ait C1772T (Pro582Ser) (rs:11549465) polimorfizmi için online (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) Primer1 veritabanı kullanılarak 2 primer çifti tasarlandı.

İçerden ileri primer (T allele):

5'- TCC AGT TAC GTT CCT TCG ATC AGT TGT AAT -3' Tm: 68°C

İçerden geri primer (C allele):

5'- AGG GCT TGC GGA ACT GCT TTC TAA GGG-3' Tm: 71°C

Dışardan ileri primer (5' - 3'):

5'- GCT GAA GAC ACA GAA GCA AAG AAC CCA T-3' Tm: 75°C

Dışardan geri primer (5' - 3'):

5'-TGT ATG TGG GTA GGA GAT GGA GAT GCA A-3' Tm: 76°C

PZR, her bir örnek için çizelge 2.1 ve 2.2.' de miktarları ve konsantrasyonları verilen 20 ul reaksiyon hacminde ve reaksiyon koşullarında çalışıldı. PZR sonrası Lys109Arg için 230bç (baz çifti)' lik, Lys656Asn için 175bç'lik, Pro582Ser için ise 450bç'lik PZR ürünü oluşturuldu. PZR çalışması için peQLab-primus 96 advanced marka cihaz kullanıldı.

Çizelge 2.1. PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları (Lys109Arg ve Lys656Asn için).

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon		1. basamak	2. basamak	3. basamak
ddH ₂ O	13,22 ul				Denatürasyon 94 °C 1dak	
Buffer	2,5 ul	1X				
dNTP	1,6 ul	10mM				
İleri primer	0,14 ul	50 pmol/ul			Birleşme 61 °C 1dak	
Geri primer	0,14 ul	50 pmol/ul				
Taq Poly.	0,4 ul	2,5 U/ul				
DNA	2 ul	50-100 ng/ml			Uzama 72 °C 90sn	
Total	20 ul					

Çizelge 2.2. Pro582Ser için PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları.

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon		1. basamak	2. basamak	3. basamak
ddH ₂ O	13,22 ul				Denatürasyon 94 °C 1dak	
Buffer	2,5 ul	1X				
dNTP	1,6 ul	10mM				
Geri primer(dışarıdan)	0,14 ul	50 pmol/ul			Birleşme 60 °C 1dak	
İleri primer(dışarıdan)	0,14 ul	50 pmol/ul				
İleri primer(içerden)	0,14ul	50 pmol/ul				
Geri primer (içerden)	0,14ul	50 pmol/ul			Uzama 72 °C 1dak	
Taq Poly.	0,4 ul	2,5 U/ul				
DNA	2 ul	50-100 ng/ml				
Total	20 ul					

2.7. 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. 120 volt akımla 20-30 dakika yatay elektroforezde yürütüldü. Daha sonra jel ultraviyole transilüminatörde görüntülendi ve kaydedildi.

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 dH₂O 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 ısıda 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.

2.8. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (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 olduğunda enzimin DNA'yı kesme kalıbı değişecektir. Yani genomik DNA'da oluşan dizi değişiklikleri, belirli kesim bölgeleri yaratır veya olanları yok eder. Bu enzim kesim özellikleri polimorfik nitelikteki genetik göstergelerin bir diğer örneği olarak kabul edilebilir. Görülüyor ki altta yatan moleküller değişiklik ne olursa olsun polimorfizm denildiği zaman genetik materyalde bireyleri (hatta aynı bireyin farklı allellerini) birbirinden farklılaştıran ve toplumda yaygın olarak bulunan değişikliklerden söz edilmektedir.

Bu çalışmada 2 SNP'in (tek nükleotid polimorfizmi) genotiplendirilmesi için uygun şekilde çoğaltılan PZR ürünleri polimorfik bölgeye uygun restriksiyon endonükleaz ile kesildi. Bu aşamada Lys109Arg için GG/CC tanıma bölgesine sahip *HaeIII* enzimi (Sibnezyme) kullanıldı.

Her bir reaksiyon için tüplere toplam 20 ul' lik hacimde olacak şekilde 10 ul PZR ürünü, 1 ul kesim enzimi (10 U/ul), 1 ul 10x enzim buffer ve 8 ul dH₂O konuldu. Enzim aktivitesi için 37 °C'de 1 gece boyunca etüvde bekletildi.

Lys656Asn için CG/CG tanıma bölgesine sahip *BstU1* enzimi (Sibnezyme) kullanıldı. Her bir reaksiyon için tüplere toplam 20 ul' lik hacimde olacak şekilde 10 ul PZR ürünü, 1 ul kesim enzimi (10 U/ul), 2.5 ul 10x enzim buffer ve 11.5 ul dH₂O konuldu. Enzim aktivitesi için 60 °C'de 1 gece boyunca etüvde bekletildi.

2.9. Amplifikasyon Refraktör Mutasyon Sistem (ARMS)

ARMS-PZR tekniğinde 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. Toplamda 4 primer kullanılır, bunlardan 2 tanesi fasta dizisine uygun ileri ve geri primer olarak en dıştan (outer) tasarlanan ortak primerlerdir. Diğer 2 tanesi fasta dizisine uygun ileri ve geri primer olarak SNP'in değişim bölgesine uygun olarak en içten (inner) tasarlanan primerlerdir. Bir tanesi normal diziye spesifikken diğeri mutant diziye spesifiktir. İçteki primerler SNP'teki biallelik değişme uygun 2. nükleotid bilerek spesifikliğı arttırmak için yanlış tasarlanır. Bu çalışmada Pro582Ser polimorfizmi için ARMS-PZR metodu tercih edildi. Dışardan ileri primer ile içerden geri primer çifti normal alleli (270 bp) gösteren PZR ürününü, içerden ileri primer ile dışarıdan geri primer çifti mutant alleli (230 bp) gösteren PZR ürününü oluşturdu. En dıştaki ileri ve geri primerler total PZR ürününü (450 bp) verdi. Bu metod enzim kullanılmasını gerektirmediği için RFLP'ye göre hem daha ucuzdur hem de tek bir PZR yaparak çok daha kısa bir sürede genotipleri elde etmek mümkündür.

2.9.1 Agaroz Jelde Görüntüleme

Jel görüntüsü için %2' lik agaroz jel hazırlandı. Enzim aktivitesini sonlandırmak ve yükleme yapabilmek için 3 ul yükleme tamponu ve 10 ul RFLP ürünü karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. 45W akımla 35 dakika yürütüldü. Sonuçları değerlendirmek için jel UV transilüminatörde görüntülendi.

2.10. İstatistiksel Değerlendirme

Tanımsal istatistik klinik ve biyokimyasal parametreler için elde edildi. Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında bağımsız-t testi uygulandı. Hasta ve kontrol gruplarında genotip dağılımı, allel frekansları ve Hardy-Weinberg değerlendirilmesinde Ki-kare uyum iyiliğı (Chi-square goodness fit) testi yapıldı. Analizlerde mutant allellerin etkisini değerlendirmek için kodominant, dominant ve resesif modeller kullanıldı. Dominant modelde homozigot yabanıl tip bireyler diğerleri ile resesif modelde homozigot mutant bireyler diğerleri ile karşılaştırıldı.

Analizlerde SPSS versiyon 15 kullanıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak $P<0,05$ düzeyinde anlamlı kabul edildi.

2.11. Etik Kurul Onayı

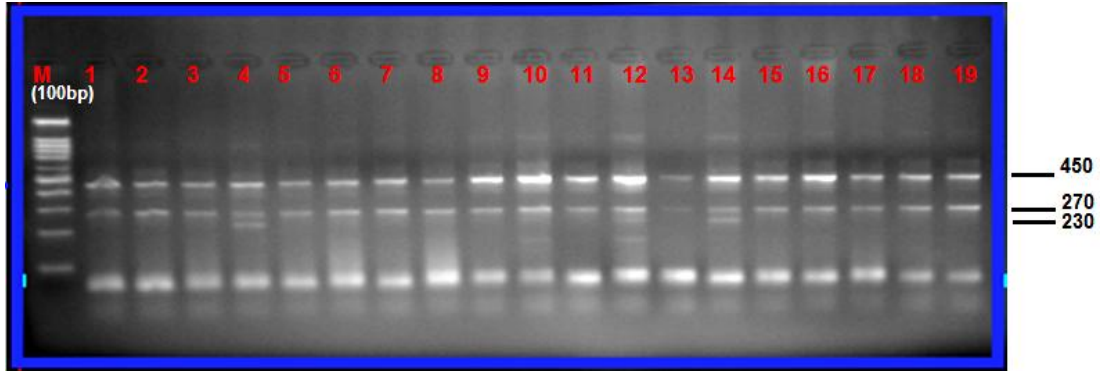
Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan “Leptin Reseptörü ve Hipoksi-indüklenebilir Faktör-1alfa genlerindeki polimorfizmlerin OSAHS’la ilişkisi” başlıklı bu çalışma 31.03.2011 tarihli ve 2011/114 karar sayılı etik kurul onayı almıştır.

3. BULGULAR

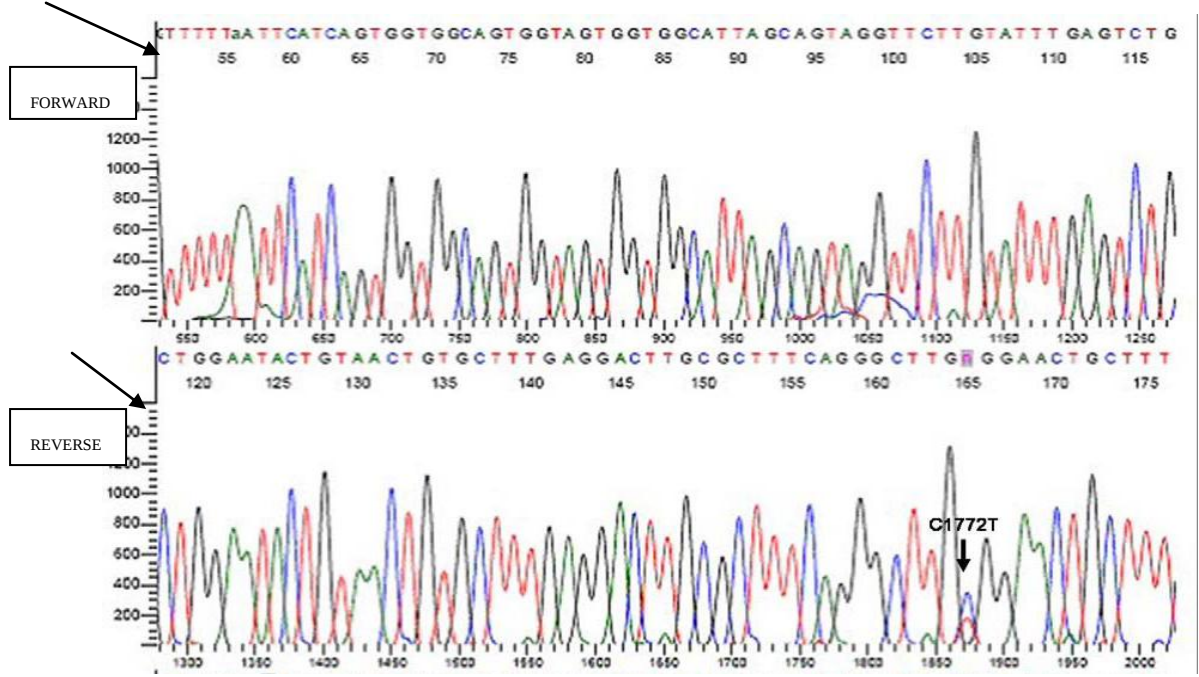
OSAHS' lı 154 hasta ve 39 sağlıklı kontrole 1 gece boyunca PSG yapıldı. Bütün hasta ve kontrol grupları önce boy (cm), kilo (kg), BMI (m²/kg), AHI (olay/saat), boyun çevresi (cm), bel çevresi (cm), kolesterol, trigliserit, HDL, LDL, sistolik kan basıncı (mmHg), diastolik kan basıncı (mmHg), %O² Saturasyon, 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. Hastalara ait genotip modelleri yukarıda belirtilen tüm parametreler ile karşılaştırıldı.

3.1. Pro582Ser Polimorfizmini İçine Alan Gen Bölgesinin PZR Sonuçları

PZR ürünü %2'lik agaroz jelde yürütüldü. ARMS-PZR metodu ile genotiplendirilmesi yapılan bu SNP'de 450, 270 ve 230 bp uzunluğunda bantlar tespit edildi. Bu bantların yeri moleküler ağırlık belirteci (100 bp'lık) ile karşılaştırıldı (Şekil 3.1.). 1 nolu kuyucukta yabancı, 4 nolu kuyucukta ise heterozigot genotipe ait bantlar mevcuttur. (M: Molekül ağırlık belirteci 50 bp).



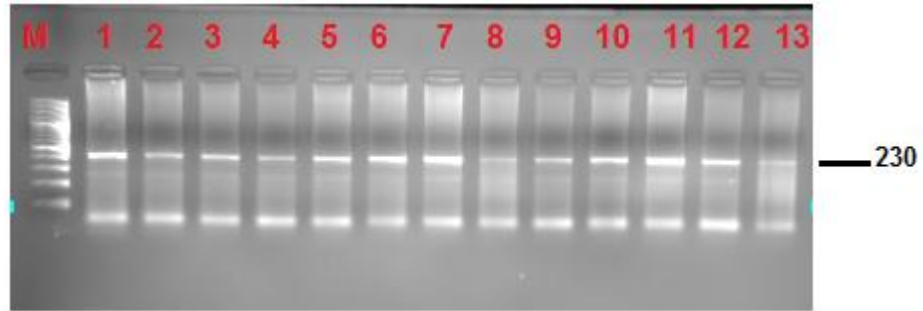
Şekil 3.1. Pro582Ser Polimorfizminin ARMS-PZR Sonucu.



Şekil 3.2. Pro582Ser polimorfizminin dizi analizi sonucu.

3.2. Lys109Arg Polimorfizmini İçine Alan Gen Bölgesinin PZR Sonuçları

154 hasta ve 39 kontrole ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. 230 baz çifti uzunluğuna karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci (M) (50bp) ile karşılaştırıldı (Şekil 3.3.).

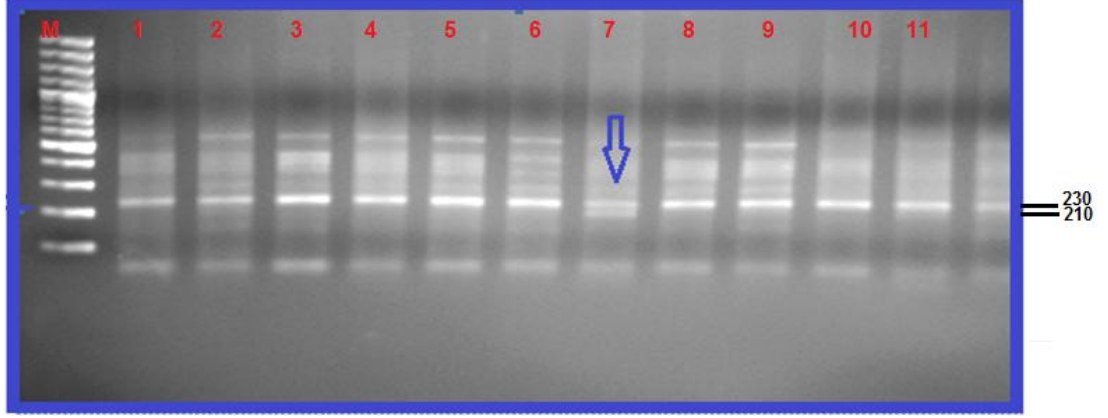


Şekil 3.3. Lys109Arg Polimorfizminin PZR Sonucu.

3.3.Lys109Arg Bölgesi PZR Ürünlerinin HaeIII Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

HaeIII, çift zincirli DNA' yı GG/CC dizisinden tanıyarak kesim yapar. PZR tepkimesi sonrası 230 bp'lik PZR ürünü HaeIII restriksiyon enzimi ile kesildi. Bu bölgede guanin içeren allel HaeIII kesim noktası taşımaktadır. AA homozigot bireylerde enzimin tanıma bölgesini içermediğinden 230 bp'lik tek bant, heterozigot bireylerde (AG) 230, 210 ve 20 bp'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen

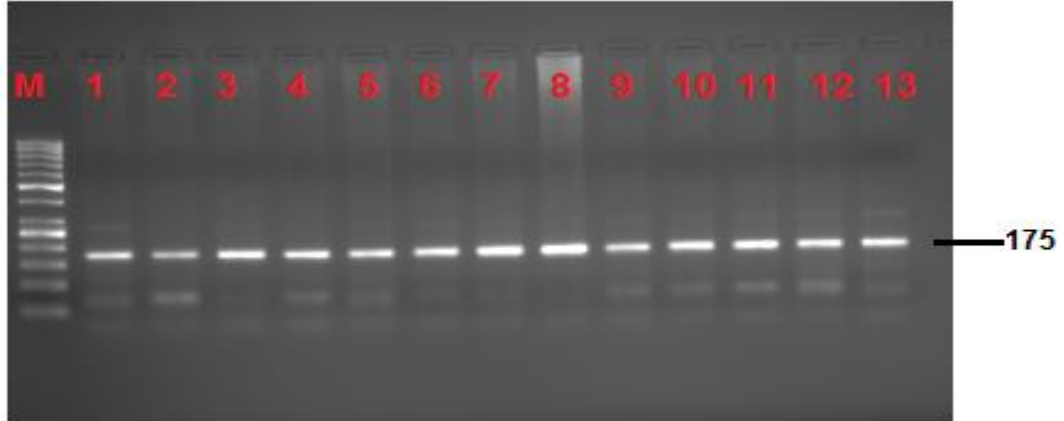
bireylerde (GG) 210 ve 20 bç'lik iki bant görüldü. Kesim sonrası ürünler %2' lik agaroz jelde yürütüldü. HaeIII kesimine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.4.' de gösterilmiştir. 1 nolu kuyucukta yabanıl, 7 nolu kuyucukta ise heterozigot genotipe ait bantlar mevcuttur. Moleküler ağırlık belirteci (M) 100 bp'dir.



Şekil 3.4. Lys109Asn Polimorfizminin RFLP Sonucu.

3.4. Lys656Asn Polimorfizmini İçine Alan Gen Bölgesinin PZR Sonuçları

PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. 175 baz çifti uzunluğuna karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci (50 bp'lik) ile karşılaştırıldı (Şekil 3.5.).

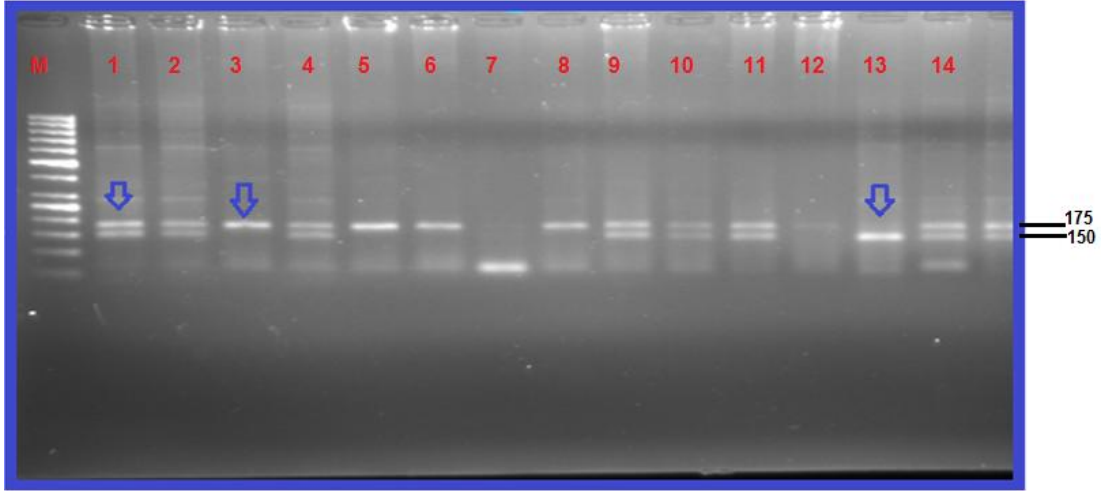


Şekil 3.5. Lys656Asn Polimorfizminin PZR Sonucu.

3.5. Lys656Asn Bölgesi PZR Ürünlerinin BstU1 Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

BstU1, çift zincirli DNA' yı CG/CG dizisinden tanıyarak kesim yapar. PZR tepkimesi sonrası 175 bç'lik PZR ürünü BstU1 restriksiyon enzimi ile kesildi. GG homozigot bireylerde enzimin tanıma bölgesini içermediğinden 175 bç'lik tek bant, heterozigot bireylerde (GC) 175, 150 ve 25 bç'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (CC) 150 ve 20 bç'lik iki bant görüldü. Kesim sonrası ürünler %2' lik agaroz jelde yürütüldü. BstU1 kesimine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Şekil 3.6.' da gösterilmiştir. 1 nolu kuyucuk heterezigot, 3 nolu kuyucuk yabanıl, 13 nolu kuyucuk ise mutant genotipe ait bantlar görülmektedir. Moleküler ağırlık belirteci 50 bp'dir.



Şekil 3.6. Lys656Asn Polimorfizminin RFLP Sonucu.

3.6. Pro582Ser Polimorfizminde Hasta ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

Bütün hasta ve kontrol gruplarının önce yaş (yıl), boy (cm), kilo (Kg), BMI (m²/kg), AHI (olay/saat), boyun çevresi (cm), bel çevresi (cm), kolesterol, trigliserit, HDL, LDL, sistolik kan basıncı (mmHg), diastolik kan basıncı (mmHg), %O₂ Saturasyonu, Epworth uykululuk skalası değerleri Çizelge 3.1.'de gösterildi. Hasta kontrol arasında kilo, BMI, AHI, boyun çevresi, bel çevresi, oksijen saturasyonu ($p<0,001$) ve yaş, sistolik kan basıncı, Epworth ($p<0,05$) anlamlı bulundu. Bu parametrelerin değerleri OSAHS'lı hastalarda daha yüksekti ancak, oksijen saturasyonu OSAHS'lılarda daha düşüktü. Diastolik kan basıncı ve lipid profili anlamlı değildi (Çizelge 3.1). Çizelge 3.2.'de kodominant ve dominant modelde anlamlı bir fark vardı, resesif model ve allel dağılımlarında fark gözlenmedi.

Pro582Ser polimorfizminde hasta bireylerde hastalığın ağırlık derecesini (şiddetini) gösteren AHI ve obezite göstergesi olarak kullanılan BMI değerlerine göre ayrılmış gruplar ile genetik modeller arasında fark yoktu (çizelge 3.3.). Çizelge 3.4.'de hasta bireylerde klinik ve biyokimyasal parametreler kodominant modelde karşılaştırılmıştır. Kodominant modelde genotipler arasında değerlendirilen parametreler açısından fark gözlenmedi. Çizelge 3.5.'de hasta bireylerde klinik ve biyokimyasal parametreler dominant ve resesif modelde karşılaştırılmıştır. Dominant ve resesif modelde genotipler arasında değerlendirilen parametreler açısından fark gözlenmedi.

Çizelge 3.1. Tüm SNP’lerde hasta ve kontrol gruplarında Yaş, BMI ve PSG karakteristiklerine ait değerler (Ortalama $\pm$ Standart Sapma= Ort $\pm$ SS, N=Birey sayısı).

Çizelge 3.1. Hasta_Kontrol	Hasta (N=154)	Kontrol (N=39)	P değeri
	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	
Yaş (Yıl)	47,81 $\pm$ 10,03	42,72 $\pm$ 9,61	0,01
Boy (cm)	172,60 $\pm$ 6,18	172,56 $\pm$ 6,75	0,98
Kilo (Kg)	90,92 $\pm$ 14,11	77,13 $\pm$ 9,12	<0,001
BMI (m2/kg)	30,54 $\pm$ 4,47	25,93 $\pm$ 2,40	<0,001
AHI (event/hour)	38,93 $\pm$ 24,83	2,78 $\pm$ 1,95	<0,001
Boyun çevresi (cm)	42,55 $\pm$ 2,94	39,72 $\pm$ 2,15	<0,001
Bel çevresi (cm)	107,79 $\pm$ 12,78	96,54 $\pm$ 7,46	<0,001
Kolesterol	201,76 $\pm$ 39,79	193,17 $\pm$ 43,86	0,24
Trigliserit	179,77 $\pm$ 111,73	157,30 $\pm$ 88,45	0,25
HDL	43,11 $\pm$ 34,25	39,63 $\pm$ 6,03	0,53
LDL	132,22 $\pm$ 74,94	122,64 $\pm$ 38,02	0,44
Sistolik (mmHg)	126,30 $\pm$ 17,84	118,59 $\pm$ 16,01	0,02
Diastolik (mmHg)	76,14 $\pm$ 12,67	72,23 $\pm$ 10,33	0,08
%O2 Saturasyon	89,68 $\pm$ 5,59	93,44 $\pm$ 2,43	<0,001
Epworth	10,21 $\pm$ 5,88	7,58 $\pm$ 5,33	0,01

Çizelge 3.2. Pro582Ser polimorfizminde hasta ve kontrol grupları arasında birey sayıları ve genotip dağılım sıklığı değerleri (N= Birey Sayısı, %=yüzdelik dilim, X^2 =Ki-kare, P=Anlamlılık düzeyi).

	GENOTİP								
Genotip _HIF1_A	Kodominant			Dominant		Resesif		Allel	
	CC	CT	TT	CC	CT+TT	CC+CT	TT	C	T
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Hasta	118	34	2	118	36	152	2	270	38
	76,6	22,1	1,3	76,6	23,4	98,7	1,3	87.7	12.3
Kontrol	21	17	0	21	17	38	0	59	17
	55,3	44,7	0	55,3	44,7	100,0	0	77.6	22.4
X ² / P	8.306 / 0.016			6.959 / 0.014		0.499 / 1.00		4.99 / 0.43	

Çizelge 3.3. Pro582Ser polimorfizminde hasta gruplarında AHI ve BMI'ya göre ayrılmış alt grupların genetik modellerle karşılaştırılması (N=Birey sayısı ve % yüzdelik dilim, χ^2 =Ki-kare, P=Anlamlılık düzeyi).

OSAHS_HIF1_A	AHI			χ^2 / P	BMI		χ^2 / P
	Hafif %	Orta %	Ağır %		Obez %	Obez olmayan %	
CC	22 75,9	27 71,1	69 79,3	2.870 / 0.58	66 77,6	52 75,4	0.118 /0.94
CT	6 20,7	11 28,9	17 19,5		18 21,2	16 23,2	
TT	1 3,4	0 0	1 1,1		1 1,2	1 1,4	
CC	22 75,9	27 71,1	69 79,3	1.018 / 0.60	66 77,6	52 75,4	0.111 / 0.85
CT+TT	7 24,1	11 28,9	18 20,7		19 22,4	17 24,6	
CC+CT	28 96,6	38 100,0	86 98,9	1.560 / 0.46	84 98,8	68 98,6	0.022 / 1.00

Çizelge 3.4. Pro582Ser polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin co-dominant modelde karşılaştırılması (Ortalama $\pm$ Standart Sapma= Ort $\pm$ SS, N=Birey sayısı).

OSAHS_kodominant HIF-1 α	CC (N=120)	CT (N=34)	TT (N=22)	P
	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	
Yaş (Yıl)	48,11 $\pm$ 10,22	46,44 $\pm$ 9,19	43,50 $\pm$ 2,12	0,58
Boy (cm)	173,10 $\pm$ 6,05	170,88 $\pm$ 6,45	176,00 $\pm$ 2,82	0,14
Kilo (Kg)	91,75 $\pm$ 13,71	87,50 $\pm$ 14,84	105,00 $\pm$ 21,21	0,11
BMI (m2/kg)	30,63 $\pm$ 4,42	30,02 $\pm$ 4,58	34,31 $\pm$ 7,52	0,39
AHI	39,61 $\pm$ 25,79	35,26 $\pm$ 20,16	46,25 $\pm$ 47,02	0,61
Boyun çevresi (cm)	42,69 $\pm$ 2,96	42,21 $\pm$ 2,99	41,50 $\pm$ 2,12	0,62
Bel çevresi(cm)	108,25 $\pm$ 12,77	105,71 $\pm$ 12,65	115,50 $\pm$ 21,92	0,41
Kolesterol	204,74 $\pm$ 40,22	191,33 $\pm$ 38,28	211,00 $\pm$ 24,04	0,22
Trigliserit	187,30 $\pm$ 119,37	155,63 $\pm$ 81,70	141,50 $\pm$ 3,53	0,32
HDL	44,15 $\pm$ 38,71	39,06 $\pm$ 9,82	52,15 $\pm$ 15,34	0,71
LDL	133,82 $\pm$ 83,90	127,44 $\pm$ 33,27	130,45 $\pm$ 9,26	0,91
Sistolik	125,64 $\pm$ 17,76	128,24 $\pm$ 18,50	140,00 $\pm$ 0,00	0,42
Diastolik	75,47 $\pm$ 12,15	77,79 $\pm$ 14,20	90,00 $\pm$ 14,14	0,19
%O2 Saturasyon	89,85 $\pm$ 4,84	89,44 $\pm$ 7,47	85,00 $\pm$ 12,72	0,46
Epworth	10,17 $\pm$ 5,87	10,15 $\pm$ 6,01	11,00 $\pm$ 8,48	0,98

Çizelge 3.5. Pro582Ser polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin dominant ve resesif modelde karşılaştırılması (Ortalama $\pm$ Standart Sapma= Ort $\pm$ SS, N=Birey sayısı).

OSAHS_ Dominant HIF_1A	CC (N=118)	CT+TT (N=36)	P değeri
	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	
Yaş (Yıl)	48,11 $\pm$ 10,22	46,44 $\pm$ 9,19	0,34
Boy (cm)	173,10 $\pm$ 6,05	170,88 $\pm$ 6,45	0,10
Kilo (Kg)	91,75 $\pm$ 13,71	87,50 $\pm$ 14,84	0,22
BMI (m2/kg)	30,63 $\pm$ 4,42	30,02 $\pm$ 4,58	0,67
AHI (event/hour)	39,61 $\pm$ 25,79	35,26 $\pm$ 20,16	0,43
Boyun çevresi (cm)	42,69 $\pm$ 2,96	42,21 $\pm$ 2,99	0,36
Bel çevresi (cm)	108,25 $\pm$ 12,77	105,71 $\pm$ 12,65	0,41
Kolesterol	204,74 $\pm$ 40,22	191,33 $\pm$ 38,28	0,11
Trigliserit	187,30 $\pm$ 119,37	155,63 $\pm$ 81,70	0,13
HDL	44,15 $\pm$ 38,71	39,06 $\pm$ 9,82	0,51
LDL	133,82 $\pm$ 83,90	127,44 $\pm$ 33,27	0,67
Sistolik (mmHg)	125,64 $\pm$ 17,76	128,24 $\pm$ 18,50	0,34
Diastolik (mmHg)	75,47 $\pm$ 12,15	77,79 $\pm$ 14,20	0,22
%O2 Saturasyon	89,85 $\pm$ 4,84	89,44 $\pm$ 7,47	0,54
Epworth	10,17 $\pm$ 5,87	10,15 $\pm$ 6,01	0,98
OSAHS_ Resesif HIF_1A	CC+CT (N=152)	TT (N=2)	P değeri
	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	
Yaş (Yıl)	47,74 $\pm$ 9,99	43,50 $\pm$ 2,12	0,55
Boy (cm)	172,61 $\pm$ 6,19	176,00 $\pm$ 2,82	0,44
Kilo (Kg)	90,80 $\pm$ 14,03	105,00 $\pm$ 21,21	0,16
BMI (m2/kg)	30,50 $\pm$ 4,45	34,31 $\pm$ 7,52	0,23
AHI (event/hour)	38,64 $\pm$ 24,64	46,25 $\pm$ 47,02	0,67
Boyun çevresi (cm)	42,58 $\pm$ 2,96	41,50 $\pm$ 2,12	0,61
Bel çevresi (cm)	107,68 $\pm$ 12,75	115,50 $\pm$ 21,92	0,39
Kolesterol	201,81 $\pm$ 40,07	211,00 $\pm$ 24,04	0,75
Trigliserit	180,38 $\pm$ 112,74	141,50 $\pm$ 3,53	0,63
HDL	43,04 $\pm$ 34,55	52,15 $\pm$ 15,34	0,71
LDL	132,42 $\pm$ 75,66	130,45 $\pm$ 9,26	0,97
Sistolik (mmHg)	126,23 $\pm$ 17,90	140,00 $\pm$ 0,00	0,28
Diastolik (mmHg)	75,99 $\pm$ 12,63	90,00 $\pm$ 14,14	0,12
%O2 Saturasyon	89,75 $\pm$ 5,52	85,00 $\pm$ 12,72	0,24
Epworth	10,16 $\pm$ 5,88	11,00 $\pm$ 8,48	0,84

3.7. Lys109Arg Polimorfizminde Hasta ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

Lys109Arg polimorfizminde kodominant, dominant ve resesif modelde anlamlı bir fark gözlenmedi (çizelge 3.6.). Çizelge 3.7.'de hasta bireylerde hastalığın ağırlık derecesini gösteren AHI ve obezite göstergesi olarak kullanılan BMI değerlerine göre ayrılmış gruplar ile genetik modeller arasında fark yoktu. Çizelge 3.8.'de hasta bireylerde klinik ve biyokimyasal parametreler kodominant modelde karşılaştırıldı. Kodominant modelde genotipler arasında değerlendirilen parametreler açısından fark gözlenmedi. Çizelge 3.9.'da hasta bireylerde klinik ve biyokimyasal parametreler dominant modelde karşılaştırıldı. Dominant modelde HDL ve LDL kolesterol genotipler arasında farklıydı ($p<0,05$). Resesif modelde ise boyun çevresi genotipler arasında anlamlı idi ($p=0,04$). Diğer parametreler dominant ve resesif modeldeki genotipler arasında farklı değildi.

Çizelge 3.6. Lys109Arg polimorfizminde hasta ve kontrol grupları arasında birey sayıları ve genotip dağılım sıklığı değerleri (N= Birey Sayısı, yüzdelik dilim=%, X^2 =Ki-kare, P=Anlamlılık düzeyi).

Genotip_Lys109Arg	Kodominant model			Dominant		Resesif		Allels	
	AA %	AG %	GG %	AA %	AG+GG %	AA+AG %	GG %	A %	G %
Hasta	121 78,6	30 19,5	3 1,9	121 78,6	33 21,4	151 98,1	3 1,9	272 88.3	36 11.7
Kontrol	27 71,1	11 28,9	0 0	27 71,1	11 28,9	38 100,0	0 0	66 85.7	11 14.3
χ^2 / P	2.243 / 0.326			0.975 / 0.388		0.752 / 1.000		0.388 / 0.560	

Çizelge 3.7. Lys109Arg polimorfizminde hasta gruplarında AHI ve BMI'ya göre ayrılmış alt grupların genetik modellerle karşılaştırılması (N=Birey sayısı ve yüzdelik dilim=%, X^2 =Ki-kare, P=Anlamlılık düzeyi).

OSAHS_Lys109Arg	AHI_Grup			χ^2 / P	BMI_Grup		χ^2 / P
	Hafif %	Orta %	Ağır %		Obez %	Obez olmayan%	
AA	23 19,0	27 22,3	71 58,7	2.299 / 0.68	64 52,9	57 47,1	2.975 / 0.23
AG	5 16,7	10 33,3	15 50,0		18 60,0	12 40,0	
GG	1 33,3	1 33,3	1 33,3		3 100,0	0	
AA	23 19,0	27 22,3	71 58,7	1.762 / 0.41	64 52,9	57 47,1	1.210 / 0.33
AG+GG	6 18,2	11 33,3	16 48,5		21 63,6	12 36,4	
AA+AG	28 18,5	37 24,5	86 57,0	0.725 / 0.69	82 54,3	69 45,7	2.484 / 0.25
GG	1 33,3	1 33,3	1 33,3		3 100,0	0	

Çizelge 3.8. Lys109Arg polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin kodominant modelde karşılaştırılması (Ort± SS Ortalama ± Standart Sapma, N=birey sayısı, P=Anlamlılık derecesi).

OSAHS_kodominant Lys109Arg	AA (N=121)	AG (N=30)	GG (N=3)	P
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
Yaş (Yıl)	47,29±10,01	48,77±9,77	52,67±10,11	0,52
Boy (cm)	172,75±6,30	172,23±5,98	172,67±2,51	0,92
Kilo (Kg)	90,95±14,93	90,53±11,19	97,00±6,08	0,75
BMI (m2/kg)	30,66±4,57	30,68±4,31	32,55±2,43	0,72
AHI	38,38±24,16	41,77±28,03	22,73±9,35	0,42
Boyun çevresi (cm)	42,40±2,95	42,90±2,86	46,00±1,00	0,09
Bel çevresi(cm)	107,87±12,95	107,20±13,08	110,33±4,50	0,91
Kolesterol	201,10±40,10	201,20±38,38	242,66±34,35	0,20
Trigliserit	175,84±90,85	185,23±167,41	287,66±196,43	0,22
HDL	40,01±9,48	55,80±74,91	42,76±4,35	0,08
LDL	125,84±33,57	157,38±154,89	142,50±8,08	0,12
Sistolik	126,21±18,56	127,83±15,63	120,00±10,00	0,75
Diastolik	76,38±13,18	76,00±11,01	70,00±10,10	0,69
%O2 Saturasyon	90,01±5,46	88,20±6,23	92,00±1,00	0,22
Epworth	10,26±5,78	10,03±6,38	8,33±6,80	0,85

Çizelge 3.9. Lys109Arg polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin dominant ve resesif modelde karşılaştırılması (Ort± SS Ortalama ± Standart Sapma, N=birey sayısı, P=Anlamlılık derecesi).

OSAHS_ Dominant Lys109Arg	AA (118)	AG+GG (36)	P değeri
	Ort ± SS	Ort ± SS	
Yaş (Yıl)	47,29±10,01	49,12±9,70	0,35
Boy (cm)	175,75±6,30	172,27±5,73	0,69
Kilo (Kg)	90,95±14,93	91,12±10,92	0,95
BMI (m2/kg)	30,46±4,57	30,85±4,19	0,66
AHI (event/hour)	38,38±24,16	40,04±27,35	0,73
Boyun çevresi (cm)	42,40±2,95	43,18±2,88	0,18
Bel çevresi (cm)	107,87±12,95	107,48±12,53	0,88
Kolesterol	201,10±40,10	204,96±39,44	0,62
Trigliserit	175,84±90,85	194,54±169,42	0,39
HDL	40,01±9,48	54,61±71,42	0,03
LDL	125,84±33,57	156,03±147,53	0,04
Sistolik (mmHg)	126,21±18,56	127,12±15,26	0,78
Diastolik (mmHg)	76,38±13,18	75,45±10,92	0,71
%O2 Saturasyon	90,01±5,46	88,55±6,04	0,18
Epworth	10,26±5,78	9,88±6,32	0,74
OSAHS_ Resesif Lys109Arg	AA+AG (151)	GG (3)	P değeri
	Ort ± SS	Ort ± SS	
Yaş (Yıl)	47,58±9,95	52,67±10,11	0,38
Boy (cm)	172,65±6,22	172,67±2,51	0,99
Kilo (Kg)	90,87±14,24	97,00±6,08	0,46
BMI (m2/kg)	30,51±4,51	32,55±2,43	0,44
AHI (event/hour)	39,05±24,91	22,73±9,35	0,26
Boyun çevresi (cm)	42,50±2,93	46,00±1,00	0,04
Bel çevresi (cm)	107,74±12,93	110,33±4,50	0,73
Kolesterol	201,12±39,64	242,66±34,35	0,07
Trigliserit	177,72±109,82	287,66±196,43	0,09
HDL	43,16±34,70	42,76±4,35	0,98
LDL	132,19±75,90	142,50±8,08	0,81
Sistolik (mmHg)	126,53±17,97	120,00±10,00	0,53
Diastolik (mmHg)	76,30±12,75	70,00±10,00	0,40
%O2 Saturasyon	89,65±5,65	92,00±1,00	0,47
Epworth	10,21±5,88	8,33±6,80	0,59

3.8. Lys656Asn Polimorfizminde Hasta ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

Lys656Asn polimorfizminde hasta ve kontrol gruplarında genotip dağılımı ve allel frekanslarında anlamlı bir fark gözlenmedi (çizelge 3.10.). Çizelge 3.11.'de hasta bireylerde hastalığın ağırlık derecesini gösteren AHI ve obezite göstergesi olarak kullanılan BMI değerlerine göre alt gruplara ayrıldı. BMI alt grubu ve kodominant model arasında anlamlı bir farklılık vardı. Bu farklılığın hangi alt gruptan kaynaklandığını belirlemek için 2x2 tabloları kullanıldı. Heterozigot bireylerin dahil olduğu tabloların anlamlı olduğu görüldü. Diğer ikili karşılaştırmalar anlamlı değildi.

Çizelge 3.12.'de hasta bireylerde klinik ve biyokimyasal parametreler kodominant modelde karşılaştırılmıştır. Kodominant modelde genotipler arasında değerlendirilen parametreler açısından kilo, BMI, boyun çevresi, bel çevresi, sistolik-diastolik kan basıncı anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Homozigot ve heterozigot gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda kilo, BMI, bel ve boyun çevresi, sistolik ve diastolik kan basıncı istatistiksel açıdan anlamlıydı, tablo 3.12.'de görüldüğü gibi heterozigotlar daha yüksek değerlere sahipti. Çizelge 3.13.'de hasta bireylerde klinik ve biyokimyasal parametreler dominant modelde karşılaştırılmıştır. Dominant modelde kilo, BMI, boyun ve bel çevresi, sistolik-diastolik kan basıncı genotipler arasında farklıydı ($p < 0,001$). Yaş dominant modelde anlamlıydı ($p = 0,06$). Diğer parametreler için dominant modelde ve resesif modeldeki (Çizelge 3.14.) genotipler arasında fark bulunmadı.

Çizelge 3.10. Hasta ve Kontrol grupları arasında birey sayıları ve genotip dağılım sıklıkları (parantez içinde % olarak verildi).

Genotip_Lys656Asn	Kodominant model			Dominant		Resesif		Allel	
	GG	GC	CC	GG	GC+CC	GG+GC	CC	G	C
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Hasta	87	64	3	87	67	151	3	238	3
	56,5	41,6	1,9	56,5	43,5	98,1	1,9	98,8	1,2
Kontrol	27	9	2	27	11	36	2	63	2
	71,1	23,7	5,3	71,1	28,9	94,7	5,3	96,9	3,1
χ^2 / P	4,936 / 0,09			2,678 / 0,14		1,321 / 0,26		1,069 / 0,29	

Çizelge 3.11. Lys656Asn polimorfizminde hasta gruplarında AHI ve BMI'ya göre ayrılmış alt grupların genetik modellerle karşılaştırılması (N=Birey sayısı ve % yüzdelik dilim, χ^2 =Ki-kare, P=Anlamlılık düzeyi).

OSAHS_Lys656Asn	AHI_Grup			χ^2 / P	BMI_Grup		χ^2 / P
	Hafif %	Orta %	Ağır %		Obez %	Obez olmayan %	
GG	17 19,5	22 25,3	48 55,2	1,000 / 0.91	38 43,7	49 56,3	10,740 / 0.005
GC	11 17,2	15 23,4	38 59,4		45 70,3	19 29,7	
CC	1 33,3	1 33,3	1 33,3		2 66,7	1 33,3	
GG	17 19,5	22 25,3	48 55,2	0,146 / 0.93	38 43,7	49 56,3	10,725 / 0.01
GC+CC	12 17,9	16 23,9	39 58,2		47 70,1	20 29,9	
GG+GC	28 18,5	37 24,5	86 57,0	0.725 / 0.69	82 55,0	68 45,0	0,163 / 1.00
CC	1 33,3	1 33,3	1 33,3		2 66,7	1 33,3	

Çizelge 3.12. Lys656Asn polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin kodominant modelde karşılaştırılması (Ort± SS Ortalama ± Standart Sapma, N=birey sayısı, P=Anlamlılık derecesi).

OSAHS_Lys656Asn kodominant	GG (87)	GC(64)	CC (3)	P değeri
	Ort ± SS	Ort ± SS	Ort ± SS	
Yaş (Yıl)	46,38±9,797	49,39±10,03	49,00 ±9,84	0,18
Boy (cm)	172,83± 6,764	172,28± 5,37	175,33± 4,50	0,65
Kilo (Kg)	87,53±13,62	95,69± 13,80	91,00± 9,53	<0,002
BMI (m2/kg)	29,28±3,97	32,30±4,62	29,70± 4,11	<0,001
AHI (olay/saat)	36,96±23,75	41,89± 26,32	22,93± 11,00	0,26
Boyun çevresi (cm)	41,87±2,75	43,53±2,884	42,00± 5,292	<0,002
Bel çevresi (cm)	105,17±13,17	111,25±11,60	109,67±13,79	0,01
Kolesterol	200,90±38,96	202,56±41,68	218,00±33,15	0,76
Trigliserit	183,72±115,0	176,06±110,75	151,00±62,55	0,83
HDL	45,48±44,99	40,28±9,97	38,000±3,60	0,64
LDL	134,59±95,45	129,02±36,45	142,00±36,71	0,88
Sistolik (mmHg)	121,49±14,16	132,94±20,60	131,67±2,88	<0,001
Diastolik (mmHg)	72,64±11,22	80,87±13,30	80,00±10,00	<0,001
%O2 Saturasyon	90,07±5,12	89,20±6,29	89,33±3,21	0,64
Epworth	10,26±5,55	9,92±6,34	13,00±6,55	0,66

Çizelge 3.13. Lys656Asn polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin dominant modelde karşılaştırılması (Ort± SS Ortalama ± Standart Sapma, N=birey sayısı, P=Anlamlılık derecesi).

OSAHS_Lys656Asn Dominant	GG (87)	GC+CC (67)	P Değeri
	Ort ± SS	Ort ± SS	
Yaş (Yıl)	46,38±9,797	49,37±9,954	0,06
Boy (cm)	172,83±6,764	172,42±5,352	0,68
Kilo (Kg)	87,53±13,620	95,48±13,627	<0,001
BMI (m2/kg)	29,2889±3,97752	32,1897±4,60765	<0,001
AHI (event/hour)	36,9655±23,75291	41,0478±26,08802	0,31
Boyun çevresi (cm)	41,87±2,753	43,46±2,981	0,001
Bel çevresi (cm)	105,17±13,170	111,18±11,597	0,004
Kolesterol	200,9070±38,96231	203,2537±41,25800	0,71
Trigliserit	183,7209±115,02037	174,9403±108,87843	0,63
HDL	45,4844±44,99878	40,1791±9,77366	0,34
LDL	134,5981±95,45020	129,6030±36,28634	0,69
Sistolik (mmHg)	121,49±14,165	132,88±20,135	<0,001
Diastolik (mmHg)	72,64±11,228	80,8313,114±	<0,001
%O2 Saturasyon	90,07±5,126	89,21±6,178	0,348
Epworth	10,26±5,558	10,06±6,334	0,831

Çizelge 3.14. Lys656Asn polimorfizminde hasta grupları içerisinde klinik ve biyokimyasal parametrelerin resesif modelde karşılaştırılması (Ort± SS Ortalama ± Standart Sapma, N=birey sayısı, P=Anlamlılık derecesi).

OSAHS_Lys656Asn_Resesif	GG+GC (151)	CC (33)	P Değeri
	Ort ± SS	Ort ± SS	
Yaş (Yıl)	47,66±9,97	49,00±9,84	0,82
Boy (cm)	172,60±6,20	175,334,50	0,45
Kilo (Kg)	90,99±14,24	91,00±9,53	0,99
BMI (m2/kg)	30,56±4,50	29,70±4,11	0,74
AHI (event/hour)	39,05±24,90	22,93±11,00	0,27
Boyun çevresi (cm)	42,58±2,91	42,00±5,29	0,74
Bel çevresi (cm)	107,75±12,84	109,67±13,79	0,80
Kolesterol	201,61±40,01	218,00±33,15	0,48
Trigliserit	180,45±112,90	151,00±62,55	0,65
HDL	43,26±34,69	38,00±3,60	0,79
LDL	132,20±75,79	142,00±36,71	0,82
Sistolik (mmHg)	126,30±18,01	131,67±2,88	0,61
Diastolik (mmHg)	76,10±12,76	80,00±10,00	0,60
%O2 Saturasyon	89,70±5,65	89,33±3,21	0,91
Epworth	10,12±5,88	13,00±6,55	0,40

4. TARTIŞMA

Obstrüktif uyku apne/hipoapne sendromu çok sayıda genin kontrolünde, çeşitli çevresel ve gelişimsel faktörlerden etkilenen kompleks bir hastalıktır. Bu hastalık tekrar eden üst havayolu tıkanmalarına eğilim gösterir. Bu eğilim üst havayolu boyutu veya fonksiyonunu etkileyen nöromusküler ve anatomik faktörler tarafından belirlenir. OSAHS için en güçlü risk faktörleri obezite ve erkek cinsiyetidir. OSAHS'ın özellikle obezite ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıklara zemin hazırlayan genlerden etkilendiği düşünülmektedir. Bu genler arasında aday olarak Leptin, LEPR, HIF-1 α , IL-6, IL-12, TNF- α gösterilebilir (Redline ve Tishler 2000).

Bildiğimiz kadarıyla ülkemizde daha önce OSAHS'lı bireylerde HIF-1 α geninde bulunan Pro582Ser polimorfizminin ilişkisini gösteren bir çalışma yoktur. Dolayısıyla, bu polimorfizmin Türk populasyonundaki sıklığı bilinmemektedir. Şimdilik OSAHS'la ilgili bilinenler, kronik intermittent hipoksinin sebep olduğu veya korunduğu durumları HIF-1 α geni ile ilişkilendirilen hayvan deneyleriyle sınırlıdır. Bunun yanında, HIF-1 α 'nın kanser, kardiyovasküler hastalıklar, VEGF, EPO, Tip 1/2 diabet gibi hastalıklarla ilişkili olduğunu gösteren ciddi çalışmalar bulunmaktadır (Li ve ark 2006, Girgis ve ark 2012).

Çalışmamızda, hasta ve kontrol grupları kayıtlarını tuttuğumuz parametrelerle karşılaştırıldı. Çizelge 3.1.'de görüldüğü gibi tüm SNP'lerde hasta kontrol arasında kilo, BMI, AHI, boyun çevresi, bel çevresi ve oksijen saturasyonu ($p<0,001$); yaş, sistolik kan basıncı ve Epworth ($p<0,05$) anlamlı bulundu.

Afrikalı Amerikalılar ve Avrupalı Amerikalılar üzerinde 2010 yılında OSAHS'la ilgili ilk defa aday gen çalışması yapılmıştır. 729 Afrika Amerikalılarında 1080 polimorfizm, 694 Avrupa Amerikalılarında 505 polimorfizm genotiplendirilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada deney grupları yaş, cinsiyet, AHI, BMI açısından da değerlendirilmiş; HIF-1 α geninde rs11549465 kodlu Pro582Ser polimorfizminde bu parametreler açısından anlamlılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Larkin ve ark 2010). Bizim çalışmamızda da HIF-1 α genine ait Pro582Ser polimorfizminde hasta ve kontroller arasında genotip dağılımı ve allel frekansları farklı değildi. OSAHS'lı grupta genetik modellere göre AHI ve BMI'daki gruplarda frekansları farklı değildi. Diğer klinik ve biyokimyasal değişkenler açısından genotipler arasında fark yoktu.

Li ve ark (2006), HIF-1 α gen polimorfizminin, aralıklı hipoksi (IH) tarafından uyarılmış, lipid metabolizmasındaki değişiklikleri içerip içermediğini değerlendirmişlerdir. HIF-1 α altünitesini kodlayan lokusta bir null allel için heterozigot olan HIF-1 $\alpha^{+/-}$ C57BL/6J fareleri ve onların yabanıl tipi HIF-1 $\alpha^{+/+}$ genotipine sahip olan fareler 5 gün boyunca kontrol koşullarına ve IH 'ye maruz bırakıldı. İntermittent hipoksiye maruz kalmış wild tip farelerin, heterozigotlara göre daha yüksek serum trigliserit seviyelerine sahip olduğunu göstermişlerdir. Li ve ark'nın (2006) yaptığı bir diğer çalışmada lipid peroksidasyonu ve dislipidemi derecesinin hipoksi şiddetine bağlı olup olmadığı, obezitenin varlığında ise CIH'a neden olup olmadığını değerlendirmişlerdir. Zayıf C57BL/6J fareyi 4 hafta için CIH'a maruz bırakmışlar, ciddi hipoksiye maruz kalan farede total kolesterol ($p<0,05$) ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolde (LDL) ($p<0,05$) önemli derecede artış gözlemişlerdir. Ciddi CIH'ın karaciğerdeki lipid peroksidasyonunu da ciddi düzeyde arttırdığını, aksine orta seviyede CIH'ın hiperlipidemiye neden olmadığını göstermişler. Sonuçta CIH'ın obezitenin varlığında lipid peroksidasyonuna ve hiperkolesterolemiye yol açtığını gözlemlemişlerdir. Döring ve ark (2010), selülitlerdeki adipöz dokunun değişiminin de araştırıldığı 25 polimorfizminden 2'sinde; ACE ve HIF-1 α 'nın etkili olabileceğini düşünmüşler, adipöz doku hipoksisi, lipid metabolizması ve inflamasyon parametrelerinde aday gen varyantlarının etkisini araştırmışlardır. Pro582Ser polimorfizmindeki mutant T allelinin selülit gelişiminde koruyucu rol oynadığını yüksek düzeyde anlamlı olarak bulmuşlardır. Bu gözlemler bize intermitten hipoksiyi ortaya çıkaracak, hastalık veya durumların lipid metabolizmasını bozabileceğini düşündürüyor. Tüm bunların ışığında, OSAHS'lı hastalar gece boyunca intermitten hipoksiye maruz kaldıklarından dolayı insan HIF-1 α genindeki bozukluklarda benzer bir etki gösterebilir. Pro582Ser polimorfizmindeki allelik değişimler genin çalışmasını etkileyebilir. Ancak bizim çalışmamızda OSAHS'lı hastalardaki genetik modellerde lipid profili açısından genotipler arasında bir farklılık yoktu.

Periferik Arter Hastalığının patogeneğinde HIF-1'in anahtar bir rol oynadığını gösteren bir çalışmada, 917 hasta ve 969 kontrol grubunda Pro582Ser polimorfizminin etkisi araştırılmış; hipertansiyon ve hiperkolesterolemiyi içeren logistik regresyon analizinde Pro582Ser polimorfizminin anlamlı olmadığını

($p=0,16$) bulmuşlardır (Bahadori ve ark 2010). Bizim çalışmamızda da genotipler arasında sistolik ve diastolik kan basınçlarında farklılık yoktu.

Kafkas ırkında 316 dayanıklı sporcu ve 304 kontrolde maksimum oksijen alımı değerlendirilmiş; Pro582Ser polimorfizmi için genotip açısından iki grup arasında önemli bir fark olduğu bulunmuştur (Döring ve ark 2010). Bu çalışma Fu ve ark (2005)'nin yaptığı çalışma ile benzerlikler taşımaktadır. HIF-1 α 'nın hidroksilasyonu demir şelatörleri ile muamele edilmiş hücrelerde engellenmektedir. Bu da HIF-1 α Pro582 protein seviyelerinde anlamlı bir artış göstermektedir. HIF-1 α Ser582 mutant protein seviyelerindeki artışın belirgin olarak daha düşük ve daha yavaş olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da genotipler arasında gece boyu oksijen saturasyonlarının ortalama değerleri homozigot mutant genotipe sahip bireylerde yabani tip genotipe sahip bireylere göre daha düşüktü, ancak istatistiksel açıdan fark yoktu. Bu durum homozigot mutant genotipe sahip olan bireylerin daha düşük oksijen saturasyonlarına maruz kaldığını düşündürmektedir.

Hem hayvan hem de insan çalışmaları Leptin ve LEPR'nin obezite mekanizmasında önemli ve güçlü faktörler olduğunu göstermiştir. OSAHS'lı bireylerde LEPR (Lys109Arg ve L656Asn) polimorfizmlerinin ilişkisini araştıran çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Şimdiye kadar ki yapılan çalışmaların çoğunluğu LEPR polimorfizmleri ile obezite arasındadır.

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 savunmuşlardır. Li ve ark (2005), 405 Kafkas çekirdek ailelerinde obezite fenotipleri ile LepR (Lys656Asn) bağlantısı değerlendirilmiştir. G allelini taşıyan kişilerin daha yağsız vücut kitlesine sahip olduğunu, bu polimorfizmin obezite fenotipine etkisi olacağını açıklamışlardır. Umabiki ve ark (2010), Lys109Arg genotiplerini incelemiş, serum leptin seviyelerinde önemli derecede ($p<0,028$) fark gözlemlemişlerdir; ancak Lys109/Lys109 ve Lys109/Arg109 ile Arg109/Arg109 arasında sistolik ve diastolik kan basıncı, plazma glukoz seviyeleri,

BMI arasında ise fark gözlememişlerdir. Roman ve ark (2006), yalnızca wild tip grupta leptin seviyelerinin önemli derecede azaldığını ($p < 0,05$) ortaya koymuşlar, kilo kaybı ve leptine yanıtta leptin reseptörü Lys656Asn polimorfizminin etkisinin wild tip (Lys656/Lys656) grupta BMI, kilo, yağ kütlesi, sistolik kan basıncı ve bel çevresi, mutant tip (Lys656/Asn656 ve Asn656/Asn656) grupta BMI, kilo ve bel çevresinin azaldığını gözlemlemişlerdir. Clement ve ark (1998), leptin sinyal kaybının insanda ciddi obeziteye sebep olduğunu ve dolaşımdaki leptin konsantrasyonunun BMI ile arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermişlerdir.

Japon popülasyonunda 130 OSAHS'lı hasta ve 50 sağlıklı kontrol grubu ile yapılan çalışmada Lys109Arg, Gln223Arg ve Lys656Asn polimorfizmlerinin genotip frekansları olmadığı bildirilmiştir (Hanaoka ve ark 2008). Kuzey Çin popülasyonunda obezite üzerinde LEPR genindeki varyantların etkisini belirlemek için, Lys109Arg, Lys656Asn ve Pro1019Pro polimorfizmlerinin aşırı kilo ve obezite ile ilişkisi araştırılmıştır. 248 aşırı kilolu veya obez ve 351 zayıf normal kontrol bireyleri çalışmaya alınmış, çalışma sonucunda Lys109Arg ve Lys656Asn polimorfizmlerinin kontrol ve hasta grupları karşılaştırıldığında genotip dağılımları ve allel frekansları farklı bulunmamıştır (Qu ve ark 2007). Bizim çalışmamızla da uyumludur. Çalışmamızda Lys109Arg ve Lys656Asn polimorfizmlerinde hasta ve kontroller arasında genotip dağılımı ve allel frekanslarının farklı olmadığı tespit edildi.

Hanaoka ve ark (2008), OSAHS'lı hastalar içinden oluşturulan AHI ve BMI grupları arasında genetik modellerde genotip bakımından anlamlı bir farklılık bulamamışlardır. Bundan dolayı LEPR'deki polimorfizmler ile OSAHS arasında bir ilişki kuramamışlardır. Kore popülasyonunda obez ve tip2 diabetli hasta grubunda LEPR gen polimorfizmlerinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, Lys109Arg polimorfizminde BMI değeri anlamlı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise OSAHS'lı hastalarda AHI grubu için hem Lys109Arg hem de Lys656Asn polimorfizmlerinin genetik modellerindeki genotip frekanslarında bir fark olmadığını bulduk. Ancak BMI grubunda Lys109Arg polimorfizminde anlamlı değilken; Lys656Asn polimorfizminde hem kodominant hem de dominant modelde genotip frekanslarının anlamlı olduğunu bulduk. Dominant modelde zayıf olan grupta wild tip birey sayısı daha fazla iken, diğer yandan obez grupta en az 1 mutant allel taşıyan birey sayısı daha fazla idi. Kodominant modelde ise yapılan ikili karşılaştırmalarda

homozigot ve heterozigot genotipler obez ve zayıf gruplar arasında farklıydı ($p=0,001$). Bu da bize mutant allelin obezite için bir risk alleli olabileceğini düşündürdü. Wauters ve ark (2001), yaşları 18-60 arasında değişen, 280 aşırı kilolu ve obez ($BMI > 25$) bayanda (198premenapozal-82postmenapozal) Lys109Arg, Lys656Asn polimorfizmlerinin obezite ve vücut yağ dağılımları ile ilişkilerinin olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bunlardan BMI veya yağ kütlesi arasında ilişki bulunmamıştır. Asn656 allelini taşıyan postmenapozal bayanlarda bel çevresinin ($p=0,03$), total karın yağının arttığını ($p=0,03$) ve Lys109 homozigotlarda leptin seviyesinin arttığını ($p=0,02$) göstermişlerdir. İspanyada Roman ve ark (2006), leptine yanıtta LEPR'deki Lys656Asn polimorfizmi ve kilo kaybı üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuçta wild tip olan grupta leptin seviyelerinin önemli derecede azaldığı gözlenmiştir. Mutant (Asn656/Asn656) alleli olan bireylerin wild tip (Lys656/Lys656) bireylere göre daha farklı bir yanıt sergilediği, Lys656/Lys656 olan bireylerde kilo, BMI, bel çevresi, sistolik kan basıncı da azalmıştır. Bizim çalışmamızda ise Lys109Arg polimorfizminde bel ve boyun çevresi genetik modellerde anlamsızdı. Lys656Asn polimorfizminde bel ve boyun çevresi kodominant ve dominant modelde anlamlı, resesif modelde ise anlamsızdı. Bu sonuçtan yola çıkarak bulgularımız, BMI'deki değişimlerin Lys656Asn polimorfizminden etkilenebildiğini düşündürdü. Kodominant ve dominant modelde bel ve boyun çevresinde ortalama değerde artış gözlemlendi. Bu artış 1 tane mutant allel taşıyan bireylerde homozigot yabanıl tip olan bireylere göre daha fazlaydı. Tüm bu sonuçlar Lys656Asn polimorfizmindeki değişikliğin obeziteyi etkileyebildiğini ortaya koydu.

Kafkas ırkında 170 obez bireye ($BMI: 30.8$) 8 hafta boyunca kalori-kısıtlanmış diyet uygulanmıştır. AA genotip grubu, minör allel taşıyıcıları ile karşılaştırıldığında AA genotipinde yüksek düzeyde hem yağ kütlesi kaybı hemde total kolesterol seviyesinde ciddi azalma olduğu, BMI, yağ kütlesi, sistolik ve diastolik kan basıncı, total kolesterol, HDL ve LDL seviyesinde gruplar arasında fark olmadığı gözlemlenmiştir (Abete ve ark 2009). Bizim çalışmamızda da Lys109Arg ve Lys656Asn polimorfizminin kodominant ve resesif modelinde trigliserit, kolesterol, HDL ve LDL açısından anlamlı fark bulunmadı. Dominant modelde ise yalnızca Lys109Arg polimorfizmde HDL ve LDL anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

83 normotansif hamile bayan ve 75 düşük trombosit sendromlu hastada Lys109Arg, Lys656Asn ve Gln223Asn polimorfizmleri çalışılmış, normotansif

sağlıklı hamile bayanlarda BMI anlamlı bulunmamış, fakat sistolik ve diastolik kan basınçları 0,0001 değerinde gözlenmiştir (Várkonyi ve ark 2010). Rosmond ve ark (2000) tarafından yapılan bir çalışmada 284 bireyde Lys109Arg, Lys656Asn polimorfizmleri antropometrik, endokrin, metabolik ve hemodinamik çeşitlilik açısından değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda Lys109 homozigotlar, Arg109 homozigotlar ile karşılaştırıldığında düşük BMI ve düşük sistolik (10.0 mm Hg) ve diastolik (7.8 mm Hg) kan basıncı gösterdiğini, Lys656Asn de ise fark olmadığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda Lys109Arg polimorfizminin genetik modellerinde sistolik ve diastolik kan basınçları anlamsızdı. Fakat Lys656Asn polimorfizminin kodominant ve dominant modellerinde sistolik ve diastolik kan basınçları ciddi düzeyde anlamlı bulundu (Çizelge 3.12. ve Çizelge 3.13.). En az 1 mutant allel taşıyan bireylerin sistolik ve diastolik kan basıncı değerlerinin daha yüksek olduğu görüldü. Resesif modelde anlamlılık yoktu.

Son zamanlarda önemi olan bir diğer konu da leptin ve LEPR ve HIF arasındaki bağlantıyı ortaya koyan çalışmaların artmasıdır. Bu genlerdeki bozuklukların obeziteye neden olabileceği buna bağlı olarak da kanser, diabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi patolojik oluşumları tetikleyebileceği vurgulanmıştır (Garvey ve ark 2009, Girgis ve ark 2012, Guo ve ark 2012). Örneğin; Grosfeld ve ark (2002) Trophoblastlardan türetilmiş BeWo hücrelerinde ekzojen HIF-1 α 'nın leptin promotor lusiferaz-haberci aktivitesini önemli ölçüde arttırdığını buldular. Li ve ark (2006), yapmış olduğu bir çalışmada intermittent hipoksi tarafından lipid metabolizmasındaki değişikliklere HIF-1 α 'nın neden olup olmadığını araştırmışlar ve serum trigliserit seviyeleri üzerine intermittent hipoksinin HIF-1 α yoluyla aracılık ettiğini, serum kolesterol seviyelerinin ise HIF-1 α yokluğunda değişmediğini göstermişlerdir. Bu konuda moleküler seviyede yapılacak in vivo ve in vitro çalışmaların çoğalması hem bizim çalıştığımız OSAHS hastalığının hem de kanser ve diabet gibi insan sağlığını ciddi düzeyde etkileyen hastalıkların patogeneze ışık tutacaktır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

OSAHS çok sayıda gen, çeşitli çevresel faktörler ve gelişimsel faktörler tarafından etkilenen kompleks bir hastalıktır. Baş ve yüz şekli, solunum kontrolü, sempatik sinir sistemi aktivitesi, bağ dokusu gevşekliliği, kas yorgunluğu, hormon seviyeleri, hipoksi 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 saptanmasında önem taşımaktadır.

Bizim çalışmamızda hasta kontrol grubu arasında kilo, BMI, AHI, boyun çevresi, bel çevresi, oksijen saturasyonu ($p<0,001$) ve yaş, sistolik kan basıncı, Epworth ($p<0,05$) incelediğimiz 3 SNP’de de anlamlı bulundu. Bu parametrelerin değerleri OSAHS’lı hastalarda daha yüksekti ancak, oksijen saturasyonu OSAHS’lılarda daha düşüktü. SNP’lerin hasta ve kontroller arasında genotip dağılımı ve allel frekanslarının farklı olmadığı bulundu.

Lys656Asn polimorfizminde OSAHS’lı hastalarda BMI’e göre ayrılmış alt grupların genotip frekanslarının karşılaştırılmasında (kodominant ve dominant genetik modelde) obez grupta en az bir mutant allele sahip bireylerin sayısı daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlıydı. OSAHS’lı hastalarda kodominant ve dominant modelde kilo, BMI, boyun ve bel çevresi, sistolik ve diastolik kan basıncını anlamlı bulduk, resesif modelde ise anlamlı değildi. Bu durum bize Lys656Asn polimorfizminin obez fenotipine yatkınlığı arttırdığını düşündürdü. Bu bulgular obezite gelişiminde önemli bir rol alabileceğini göstermektedir.

Leptin reseptöründe ve HIF-1 α genindeki 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. Son zamanlardaki verilere göre Leptin-LEPR ve HIF-1 α genleri arasında karşılıklı bir etkileşim vardır. Fakat bu konudaki çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bu genler arasındaki etkileşimi açıklayan yeni çalışmalar başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıkların aydınlatılmasına katkı sağlayabilecektir.

6. ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEPTİN RESEPTÖRÜ VE HIPOKSİ-İNDÜKLENEBİLİR FAKTÖR-1ALFA GENLERİNDEKİ POLİMORFİZMLERİN OSAHS'LA İLİŞKİSİ

Sümeysa ÇETİNKAYA

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2012

Obstrüktif apne/hipoapne sendromu (OSAHS) obez bireylerde yaygın görülen çok odaklı bir hastalıktır. Leptin hormonu yağ hücrelerinde üretilen, iştah ve enerji harcanmasının düzenlenmesinden sorumlu olan bir sinyal faktörüdür. Leptinin spesifik reseptörü olan LEPR genellikle hipotalamusta işlevseldir. OSAHS'da sık görülen bir durum kronik intermittent hipoksi (CIH) 'dir. Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 α (HIF-1 α), hipoksik koşullar altında oksijen homeostazının düzenlenmesine yanıt sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür.

Çalışmaya Konya popülasyonundan cinsiyeti erkek 154 hasta ve 39 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu dahil edilmiştir. Bütün hasta ve kontrol bireylerine polisomnografi testi uygulanmıştır. Gruplar, genotip dağılımı; yaş, BMI (Body Mass Index), boyun ve bel çevresi, AHI (Apne Hipoapne İndeksi), Total Kolesterol, Trigliserit, HDL (High-density lipoprotein), LDL (Low-density lipoprotein), Kan basıncı (Sistolik ve Diastolik), SpO₂ (Oksijen saturasyonu) ve Epworth Uykululuk skalası değişkenleri ile karşılaştırılmıştır. OSAHS'ın patofizyolojik sinyal yollarını etkileyip etkilemediğini belirlemek için HIF-1 α genindeki Pro582Ser polimorfizm ile LEPR genindeki Lys109Arg ve Lys656Asn polimorfizmlerinin genotip dağılımları ARMS-PZR ve PZR-RFLP moleküler tanı yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Tüm SNP'lerde hasta ve kontrol bireyleri arasında yaş, kilo, BMI, AHI, boyun çevresi, bel çevresi, oksijen saturasyonu ($p<0,001$) ve sistolik kan basıncı, Epworth ($p<0,05$) anlamlı bulundu. Bu parametrelerin değerleri OSAHS'lı hastalarda daha yüksekti ancak, oksijen saturasyonu OSAHS'lılarda daha düşüktü. Pro582Ser ve Lys109Arg polimorfizminde hem hasta hemde kontrol grubunda genotip dağılımları ve allel sıklıkları arasında parametrelere göre anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Yalnızca Lys109Arg polimorfizminde dominant modelde HDL ve LDL değerini anlamlı bulundu ($p<0,05$), Lys656Asn polimorfizminde ise OSAHS'lı hasta grubunun kodominant ve dominant modelinde kilo, BMI, bel ve boyun çevresi, sistolik ve diastolik kan basıncını anlamlı bulundu. Sonuç olarak gerek LEPR gerekse HIF-1 α geninde belirlenen diğer polimorfizmlerin moleküler tarama yöntemleri kullanılarak yeteri kadar veri bulunmayan Türk popülasyonunda etkilerinin araştırılması uygun olacaktır.

Anahtar Sözcükler: OSAHS; LEPR;HIF-1 α ; Polimorfizm; Lys109Arg; Lys656Asn; Pro582Ser; PZR-RFLP; ARMS.

7. SUMMARY

ASSOCIATION OF THE LEPTIN RECEPTOR GENE AND HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR-1 α GENE POLYMORPHISMS WITH OSAHS

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. Firstly, the aim of this study is to investigate the relation between OSAHS and Lys109Arg and Lys656Asn polymorphisms in LEPR. Chronic intermittent hypoxia (CIH) is a frequent feature of OSAHS. Cellular response to intermittent hypoxia and reoxygenation should provide insight into pathophysiological pathways in OSAHS. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) is a transcription factor that is responsible for the regulation of oxygen homeostasis under hypoxic conditions. The second aim of this study is to investigate the relation between OSAHS and Pro582Ser polymorphism in LEPR.

Our study was included 154 patients and 39 healthy control individuals who were all male, from Konya populations. Diagnostic polysomnography was performed in all patients and control individuals. The results between both groups and distributions of genotyping were compared with data of ages, weight, BMI (Body Mass Index), neck and waist circumference, AHI (Apnea Hypoapnea Index), total cholesterol, triglyceride, HDL (High-density lipoprotein), LDL (Low-density lipoprotein), sistolic-diastolic blood pressure (SBP), SpO₂ (saturation of oxygen) and Epworth Sleepiness Scale. The distribution of genotyping of Lys109Arg and Lys656Asn polymorphisms was determined with the method PCR-RFLP of a molecular diagnostic and HaeIII and BstU1 restriction enzyme was used, respectively. ARMS-PZR method was used for Pro582Ser polimorfizm. There were statistically significant difference between patients with OSAHS and control individulas in terms of weight, BMI, AHI, neck and waist circumference, SpO₂ (P<0,001) and ages, sistolik blood pressure, Epworth characteristics (p<0,05). These data values was higher in OSAHS patiens but, SpO₂ was lower. In LEPR polimorphisms any interaction was not determined between distributions of genotyping and allele frequencies. There were statistically significance differences HDL and LDL values in dominant models in Lys109Arg. OSAHS patients in dominant and co-dominant models in Lys656Asn polimorphism was statistically significant weight, BMI, neck and waist circumference, sistolic-diastolic blood pressure.

By using molecular research methods of other polymorphisms in both leptin receptor and HIF-1 α , it is necessary to search the effect of Leptin receptor and HIF-1 α on OSAHS in Turkish population that has not enough data. It needs to widespread studies for determination of genetic basic on multifactorial patients like OSAHS.

Key Words: OSAHS; LEPR; HIF-1 α ; Polimorfizm; Lys109Arg; Lys656Asn; Pro582Ser; PZR-RFLP; ARMS.

8. KAYNAKLAR

8. KAYNAKLAR

1. Abete I, Goyenechea E, Crujeiras A, Martı́nez AJ. Inflammatory State and Stress Condition in Weight lowering Lys109Arg LEPR Gene Polymorphism Carriers. *Archives of Medical Research*. 2009;40: 306-310.
2. A report of National Commission on Sleep Disorders Research. *Wake Up America: A National Sleep Alert*. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1995.
3. Aslan K, Serdar Z, Tokullugil HA. Multifonksiyonel Hormon: Leptin. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2004;30: 113-118.
4. Bado A, Levasseur S, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJM. The stomach is a source of leptin. *Nature*. 1998;393: 648-8.
5. Bahadori B, Uitz E, Mayer A, Harauer J, Dam K, Truschnig-Wilders M, Pilger E, Renner W. Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene and peripheral artery disease. *Vasc Med*. 2010;15(5): 371-4.
6. Brann DW, Wade MF, Phandapani KM, Mahesh VB, Buchanan CD. Leptin and reproduction. *Steroids*. 2002;67: 95-104.
7. Benarroch EE. Hypoxia-induced mediators and neurologic disease. *Neurology*. 2009; 73(7):560-565.
8. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2003;108:79-85.
9. Clement K, Vaisse C, Lahlou N. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998;392:398-401.
10. Considine RV, Sinha MK, Heimen ML, Kriaciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N Eng J Med*. 1996;334:292-95.
11. Considine RV, Caro JF. Leptin and regulation of bodyweight. *Int. J Biochem Cell Biol*. 1997; 29: 1255-72.
12. Danny JE, Malhotra A. Pathophysiology of Adult Obstructive Sleep Apnea. *The American Thoracic Society*. 2008;5:144-15.
13. Demir AU, Sahin A. Obstruktif uyku apnesi (OUAS) patofizyolojisi ve tanımı. *Türk Kardiyoloji Seminerleri*. 2004;4(6):564-73.
14. Demir AU. Obstruktif uyku apne sendromu (OUAS) ve obezite. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2007;38:177-93.
15. Döring F, Onur S, Fischer A, Boulay MR, Pérusse L, Rankinen T, Rauramaa R, Wolfarth B, Bouchard C. A common haplotype and the Pro582Ser polymorphism of the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1) gene in elite endurance athletes. *Institute of Human Nutrition and Food Science. J Appl Physiol*. 2010;108:1497-1500.
16. Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165: 934-939.
17. Fleetham JA. Sleep disordered breathing awoken. *Thorax*. 2004;59:5-6.
18. Fu XS, Choi E, Bubley GJ, Balk SP. Identification of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) polymorphism as a mutation in prostate cancer that prevents normoxia-induced degradation. *Fleetham J. Sleep disordered breathing awoken-Editorial. Thorax*. 2005;63: 215-221.
19. Garvey JF, Taylor CT, McNicholas WT. Cardiovascular disease in obstructive sleep apnea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation. *European Respiratory Journal*. 2009;33:1195-1205.
20. Girgis CM, Cheng K, Christopher HS, Gunton JE. Novel links between HIFs, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2012;23-8.
21. Gonzalez R, Xu Y, Guo S, Watters A, Zhou W, Leibovich SJ. Leptin upregulates VEGF in breast cancer via canonic and noncanonical signalling pathways and NF κ B/HIF-1 α activation. *Cell Signalling*. 2010;22:1350-1362.
22. Göçmen H, Karadağ M. Obstruktif uyku apnesi sendromu epidemiyolojisi. *Turkiye Klinikleri J Surg Med Sci*. 2007;3:7-10.
23. Green ED, Maffei M, Braden W, Proenca R, Desilva V, Zhang Y, Chua SC, Leibel RL, Weisbenbach J, Friedman JM. The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and

- mapping on the physical, cytogenetic, and genetic map of chromosome 7. *Genome Research*. 1995;5:5-12.
24. Grosfeld A, Andre J, Mouzon S, Berra E, Pouyssegur J, Guerro-Millo M. Hypoxia-inducible Factor 1 Transactivates the Human Leptin Gene Promoter. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277:42953-42957.
 25. Guilleminault C, Eldridge F, Dement WC. Insomnia with sleep apnea: a new syndrome. *Science*. 1973;181:856-8.
 26. Guilleminault C, Stoohs E, Clerk A. A cause of excessive daytime sleepiness. The upper airway resistance syndrome. *Chest*. 1993;104:781-87.
 27. Guilleminault C, Abad VC. Obstructive sleep apnea syndromes. *The Medical Clinics of North America*. 2004;88:611-30.
 28. Guo S, Liu M, Wang G, Torroella-Kouri M, Gonzalez-Perez RR. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1825(2):207-22.
 29. Hanaoka M, Yu X, Urushihata K, Ota M, Fujimato K, Kubo K. Leptin and Leptin Receptor Gene Polymorphisms in Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Chest*. 2008;133:79-85.
 30. Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterol*. 2001;121:79-90.
 31. Hekimoğlu Aşkın. Leptinin Fizyopatolojik Olaylardaki rolü. *Dicle Tıp Dergisi*. 2006;33:259-267.
 32. Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM et al. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem*. 2002;277:26351-26355.
 33. Hiestand DM, Britz P, Goldman M, Phillips M. Prevalence of symptoms and risk of sleep apnea in the US population: Results from the national sleep foundation sleep in America. *Chest*. 2006;130:780-86.
 34. Houwelingen KG, Uffelen R, Vliet ACM. The sleep apnoea syndromes. *European Heart Journal*. 1999;20:858-66.
 35. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002;109: 1125-31.
 36. Jessica Cassavaugh and Karen M. Lounsbury. Hypoxia-Mediated Biological Control. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011;112:735-44.
 37. Jianguo L, Marta B, Nanayakkara A, Savransky V, Fried, SK, Semenza GL, Polotsky V. Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor-1. *Physiol Genomics*. 2006;25:450-57.
 38. Kaparinos A, Sampsonas F, Karkoulas K, Spiropoulos K. Obstructive sleep apnoea syndrome and genes. *The Journal of Medicine*. 2006; Vol. 64: No. 8, Netherlands.
 39. Kelsey JL. Breast cancer epidemiology: Summary and future direction. *Epidemiol Rev*. 1993;15:256-63.
 40. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006;70:1469-80.
 41. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Polychronidis A, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, Sivridis E. Endogenous markers of hypoxia/anaerobic metabolism and anemia in primary colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2006;97(7):582-88.
 42. Köktürk O, Tatlıcıoğlu T, Kemaloğlu Y. Habituel horlaması olan olgularda obstruktif uyku apne sendromu prevalansı. *Tuberkuloz ve Toraks*. 1997;45:7-11.
 43. Köktürk O. Uykuda solunum bozuklukları. Tarihçe, tanımlar, hastalık spektrumu ve boyutu. *Tuberkuloz ve Toraks dergisi*. 1998;46(2):187-92.
 44. Larkin EK, Patel SR, Goodloe RJ, Li Y, Zhu X, Gray-McGuire C, Adams MD, Redline S. A candidate gene study of obstructive sleep apnea in European Americans and African Americans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(7):947-53.
 45. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1_α (HIF1_α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*. 2001;21: 3995-4004.
 46. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick R. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. 2002;16:1466-1471.
 47. Lee J, Bae S, Jeong J, Kim S, Kim K. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 2004;36:1-12.

48. Li J, Grigoryev DN, Ye SQ, Thorne L, Schwartz AR, Smith PL, O'Donnell CP, Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice. *J Appl Physiol*. 2005a;99: 1643–48.
49. Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, Marino RL, Rodriguez A, Hubbard WC, O'Donnell CP, Polotsky VY. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res*. 2005b;97: 698–706.
50. Li J, Bosch-Marce M, Nanayakkara A, Savransky V, Fried S, Semenza G, Polotsky V. Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor-1 α . *Physiology Genomics*. 2006;25:450-457.
51. Lopez PP, Stefan B, Schulman CI, Byers PM. Prevalence of sleep apnea in morbidly obese patients who presented for weight loss surgery evaluation: more evidence for routine screening for obstructive sleep apnea before weight loss surgery. *The American Surgeon*. 2008;74(9):834-38.
52. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, and Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005;105:659–9.
53. Marik PE. Leptin, Obesity, and Obstructive Sleep Apnea. *Chest*. 2000;118:569-71.
54. 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.
55. Maynard MA, Ohh M. Molecular targets from VHL studies into the oxygen-sensing pathway. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005;5(5):345-56.
56. McClean KM, Kee F, Young IS, Elborn JS. Obesity and the lung: 1. Epidemiology. *Thorax*. 2008;63:649.
57. Meoli AL, Casey Kenneth R, Clark Robert W. Position paper. Hypopnea in sleep-disordered breathing in adults. *Slee*. 2001;24:469-70.
58. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W. Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci*. 2003;116:1319–26.
59. Oksanen L, Tiitinen A, Kaprio J, Koistinen HA, Karonen SL, Kontula K. No evidence for mutations of the leptin or leptin receptor genes in women with polycystic ovary syndrome. *Molecular Human Reproduction*. 2000;10:873-876.
60. Okumura M, Yamamoto M, Sakuma H. Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: reciprocal involvement of PKC- α and PPAR expression. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1592:107–16.
61. OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601007>. 15.05.2009.
62. Pack, AI. Obstructive sleep apnea. *Advances in Internal Medicine*. 1994;39:517.
63. Partinen M, McNicholas T. Epidemiology, morbidity and mortality of the sleep apnoea syndrome. *European Respiratory Monograph*. 1998;10:63-74.
64. Park S, Dadak AM, Haase V, Fontana L, Giaccia AJ, Johnson R. SHypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α): role of cytoplasmic trapping of HIF-2 α . *Mol Cell Biol*. 2003;23:4959-71.
65. Pasarica M. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*. 2009;58: 718-725.
66. Peng YJ, Yuan G, Ramakrishnan D, Sharma SD, Bosch-Marcé M, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR. Heterozygous HIF-1 deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol*. 2006;577:705–716.
67. Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, Rubin AE, Smith PL, Schwartz AR, O'Donnell CP. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J Physiol*. 2003;552: 253–64.
68. Prior SJ, Hagberg JM, Phares DA, Brown MD, Fairfull L, Ferrell RE, Roth SM. Sequence variation in hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1A): association with maximal oxygen consumption. *Physiol Genomics*. 2003;15(1):20-6.
69. Prabhakar NR, Kumar GK, Nanduri J, Semenza GL. ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9:1397–1403.

70. Qu Y, Yangc Z, Jind F, Sunc L, Zhanga C, Sune H, Wange B, Wanga L. Analysis of the relationship between three coding polymorphisms in LEPR gene and obesity in northern Chinese. *Obesity Research & Clinical Practice*. 2007;1:261-266.
71. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Russe L, Lindell K, Carlsson B, Bouchard C, Rntorp P. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Hypertension In Obesity And The Leptin ReceptorGene Locus. 2000;85:9.
72. Rabie T, Marti HH. Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology*. 2008;23:263-74.
73. Redline S, Tishler PV. The genetics of sleep apnea. *Sleep Medicine*. 2000;4(6):583-602.
74. Roman D, Fuente R, Sagrado M, Izaola O, Vicente R. Leptin Receptor Lys656Asn Polymorphism Is Associated with Decreased Leptin Response and Weight Loss Secondary to a Lifestyle Modification in Obese Patients. *Archives of Medical Research*. 2006;37: 854-859.
75. Sandoval DA, Davis SN. Leptin: Metabolic control and regulation. *J Diabetes Complications*. 2003;17:108-113.
76. Schwartz AR, Gold AR, Schubert N. Effect of weight loss on upper airway collapsibility in obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144:494-8.
77. Schwab RJ, Gupta KB, Geffer WB, Metzger LJ, Hoffman EA, Pack AI. Upper airway and soft tissue anatomy in normal subjects and patients with sleep-disordered breathing. Significance of the lateral pharyngeal walls. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:1673-89.
78. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404:661-71.
79. Sean MC, Apoor SG, Virend KS. Obstructive Sleep Apnea. *Ann Intern Med*. 2005;142:187-97.
80. Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 30 to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:5680-84.
81. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992;12:5447-54.
82. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Seminars in Cancer Biology*. 2009;19:12-16.
83. Sell H. The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. *Trends Endocrinology Metabolism*. 2006; 17:416-422.
84. Shanchun G, Mingli L, Guangdi W, Marta T, Ruben R, Gonzalez P. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signalling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1825:207-222.
85. Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem*. 1999;274: 35832-39.
86. Silke MD, Sean MC. *Docleveland Clinic Journal Of Medicine*. 2007;74:12.
87. Sousa AGP, Cercato C, Mancini MC, Halpern A. Obesity and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *International Association for the Study of Obesity*. 2008;9: 340-354.
88. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83(7):1263-71.
89. Taylor CT. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem J*. 2008; 409:19-26.
90. 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.
91. The report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep*. 1999;22(5): 667-89.
92. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue:white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc*. 2001; 60:329-339.
93. Tritos NA, Mantzoros CS. Leptin; its role in obesity and beyond. *Diabetologia*. 1997;40:1371-79.
94. Umabiki M, Tsuzaki K, Kazuhiko K, Narumi N, Sano Y, Matsuoka Y, Kitaoka K, Okami Y, Sakane N, Higashi A. The improvement of sweet taste sensitivity with decrease in serum leptin levels during weight loss in obese females. *Tohoku J. Exp. Med*. 2010;220:267-271.

95. Várkonyi T, Lázár L, Molvarec A, Gábor N, Rigó J, Nagy B. Leptin receptor (LEPR) SNP polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analysis. *BMC Medical Genetics*. 2010; 11:25.
96. Vgontzas AN, Tan TL, Bixler EO, Martin LF, Shubert D, Kales A. Sleep apnea and sleep disruption in obese patients. *Arch Intern Med*. 1994;154:1705-11.
97. Wang B. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch*. 2007;455:479-492.
98. Wauters M, Mertens I, Chagnon M, Rankinen T, Considine Y, Chagnon YC, Van LF, Bouchard C. Polymorphisms in the leptin receptor gene, body composition and fat distribution in overweight and obese women. *International Journal of Obesity*. 2001;25:714-720.
99. Xie A, Skatrud JB, Crabtree DC, Puleo DS, Goodman BM, Morgan BJ. Neurocirculatory consequences of intermittent asphyxia in humans. *J Appl Physiol*. 2000;89:1333-1339.
100. Yamada N, Horikawa Y, Oda N, Lizuka K, Shihara N, Kishi S, Takeda J. Genetic Variation in the Hypoxia Inducible -1 α Gene Is Associated with Type 2 Diabet in Japanese. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90:5841-47.
101. Yiannakouris N, Yannakoulia 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.
102. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med*. 1993;328:1230-35.
103. Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1217-39.
104. Young T, Shahar E, Nieto FJ. Predictors of sleep disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Arch Intern Med*. 2002;162(8):893-900.
105. Yong-Jun Liu, Sonia MS, Rocha-Sanchez, Peng-Yuan Liu, Ji-Rong Long, Yan Lu, Leo Elze, Robert R. Recker, Hong-Wen. Tests of linkage and/or association of the LEPR gene polymorphisms with obesity phenotypes in Caucasian nuclear families. *Osteoporosis Research Center and Department of Biomedical Sciences*. 2003.
106. Yuan G, Nanduri J, Bhasker CR, Semenza GL, Prabhakar NR. Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *J Biol Chem*. 2005;280:4321-28.
107. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Freidman JM. Positional cloning of the Mouse obese gene and its human homolog. *Nature*. 1994;372:425-32.
108. Zhang Q, Wang Y, Hvang ES. Changes in racial/ethnic disparities in the prevalence of Type 2 diabetes by obesity level. *Ethn Health*. 2009;14:439-57.

9. EKLER

EK- A Etik Kurul Kararı

**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI**

Toplantı Sayısı:05

Toplantı Tarihi:31.03.2011

Karar Sayısı:2011/114: Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.S.Sennur DEMİREL'in "Leptin Reseptörü (Lys109Arg,Lys656Asn) ve Hipoksi-indüklenabilir Faktör 1Alfa (C1772T) genlerindeki polimorfizmlerin OSAHS'la ilişkisi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 28.03.2011 tarihli dilekçesi ekleri görüşüldü,yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.S.Sennur DEMİREL'in sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

**ASLI GİBİDİR
30.03.2011**

**Prof.Dr. Rahmi ÖRS
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı**

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 laboratuvarı 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. İstedığınız 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 araştırmacının Adı soyadı, İmzası:
Biyolog Sümeyra ÇETİNKAYA

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 Ankarada doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ankara'da tamamladı. Lisans eğitimini Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde 2009 yılında tamamladı. 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.