

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İRRİTABL BARSAK SENDROMLU HASTALARDA LEPTİN VE
LEPTİN RESEPTÖR GEN POLİMORFİZMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Kenan ÇEVİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY

MERSİN – 2012

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İRRİTABL BARSAK SENDROMLU HASTALARDA LEPTİN VE
LEPTİN RESEPTÖR GEN POLİMORFİZMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Kenan ÇEVİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP –SBE TTB (KÇ) 2010-6 YL kodlu proje olarak desteklenmiştir.

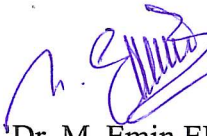
Tez No: 213

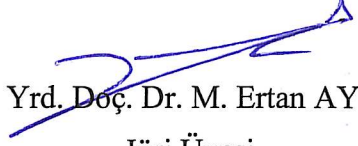
MERSİN – 2012


Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “İrritabl Barsak Sendromlu Hastalarda Leptin ve Leptin Reseptör Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 05/06/2012

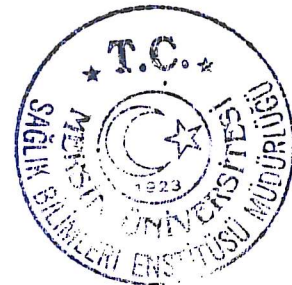

Prof. Dr. M. Emin ERDAL
Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY
Jüri Üyesi


Yrd. Doç. Dr. Savaş AKTAŞ
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun...20.06.2012...tarih ve 2012/111...sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan, danışman hocam Sn.Yrd. Doç. Dr. M.Ertan AY'a, tezimin hazırlanması boyunca gösterdiği titizlik, özveri ve bilimsel katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Anabilim Dalı Başkanımız, Sn. Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a, anabilim dalımızın diğer değerli hocaları; Sn. Doç. Dr. İ.Ömer BARLAS'a ve Sn. Yrd. Doç. Dr.Özlem İZCİ AY'a yüksek lisans eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkıdan dolayı teşekkür ederim. Tez çalışmamda özellikle deneysel aşamada karşılaştığım zorluklarda benden akademik desteğini esirgemeyen değerli hocam Sn. Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a teşekkür ederim.

Tezimde yer alan hasta gruplarının toplanması sırasındaki yardımlarından dolayı, ME.Ü. Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sn.Yrd.Doç Dr. Fehmi ATEŞ'e, tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Arş.Gör. İlter YAZICI ve Arş.Gör. Mehmet Ali SUNGUR'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca, her türlü desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma, özellikle deneysel aşamada her türlü yanımda olan değerli arkadaşlarım Arş.Gör. Ümit KARAKAŞ ve Arş.Gör. Gurbet DOĞRU'ya ve diğer anabilim dallarındaki çalışma arkadaşlarım ile teknik ve idari personele teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| KABUL ve ONAY | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| İÇİNDEKİLER | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | x |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | xi |
| ÖZET | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİ | 3 |
| 2.1. İritabl Barsak Sendromu | 3 |
| 2.1.1. İBS Epidemiyolojisi | 4 |
| 2.1.2. İBS Tanısı | 5 |
| 2.1.3. Hastalığın Sınıflandırılması | 7 |
| 2.1.3.1. Alt Grupların Sınıflandırılmasında Kullanılan Semptomlar..... | 7 |
| 2.1.4. Hastalığın Patofizyolojisi..... | 8 |
| 2.1.4.1. Bozulmuş Motilite | 8 |
| 2.1.4.2. Visseral Duyarlılık | 8 |
| 2.1.4.3. Psikososyal Faktörler | 9 |
| 2.1.4.4. Nörotransmitter Dengesizliği..... | 9 |
| 2.1.4.5. Genetik Faktörler | 10 |
| 2.2. Leptin | 12 |
| 2.2.1. Leptinin Biyolojisi ve Yapısı..... | 12 |
| 2.2.2. Leptin Geni | 13 |
| 2.3. Leptin Reseptörleri | 14 |
| 2.3.1. İzofom ve Yapısı | 14 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.2. Leptin Reseptör Geni | 16 |
| 2.4. Hücre İçi Leptin Sinyal Yolakları | 17 |
| 2.4.1. Janus Kinaz Sinyal İleti ve Transkripsiyon Aktivatörleri (JAK/STAT) Yolağı | 17 |
| 2.4.1.1. Sitokin Sinyal İnhibitör(SOCS) Proteinleri | 19 |
| 2.4.1.2. Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz (MAPK) Yolağı | 20 |
| 2.4.1.3. AMP Bağımlı Protein Kinaz (AMPK) Yolağı | 21 |
| 2.4.1.4. Fosfatidilinozitol 3 Kinaz (PI3K) Yolağı | 22 |
| 2.5. Gastrointestinal Boşlukta Leptin | 24 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 25 |
| 3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler | 25 |
| 3.1.1. Kullanılan Cihazlar | 25 |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 26 |
| 3.1.3. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler | 27 |
| 3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması | 28 |
| 3.3. Leptin (LEP) Geni Val94Met (G>A, rs17151919) ve Leptin Reseptör (LEPR) Geni (G>A, rs3790434) Polimorfizmlerinin Real Time PCR Yöntemiyle Moleküler Genetik Analizi | 29 |
| 3.3.1. DNA'nın İzolasyonu | 29 |
| 3.3.2. Real Time PCR İle Genotiplerin Belirlenmesi | 30 |
| 3.3.2.1. Real-Time PCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanışı | 32 |
| 3.3.2.2. Real-Time PCR reaksiyon Şartları | 32 |
| 3.4. İstatistiksel Değerlendirme | 32 |
| 4.BULGULAR | 34 |
| 4.1. Real-Time PCR İle İlgili Bulgular | 34 |
| 4.1.1. Leptin geni(val94met) Polimorfizmine Ait Genotiplerin İBS İle İlişkisi | 38 |
| 4.1.2. Leptin Geni İle İBS Arasındaki İstatistiksel İlişki | 38 |
| 4.1.3. Leptin Reseptör Gen (rs3790434) Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol ve İBS'li Hasta Gruplarındaki Dağılımı | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.4. Leptin Reseptör Geni İle İBS Arasındaki İstatistiksel İlişki..... | 40 |
| 5.TARTIŞMA | 42 |
| 6.SONUÇ ve ÖNERİLER | 49 |
| 7.KAYNAKLAR | 50 |
| ÖZGEÇMİŞ | 59 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Genetik ve psikolojik faktörler ile daha sonra gelişen irritabl barsak sendromu arasındaki kuramsal ilişki..... | 9 |
| Şekil 2.2. Leptin proteininin helikal loop yapısı | 13 |
| Şekil 2.3. İnsan leptin geninin kromozom 7q31.3'deki lokalizasyonu | 13 |
| Şekil 2.4. İnsan leptin reseptör geninin kromozom 1p31'deki lokalizasyonu | 14 |
| Şekil 2.5. Leptin reseptör gen izoformları | 15 |
| Şekil 2.6. Leptin dimerizasyonu | 16 |
| Şekil 2.7. OB-Rb aracılığı ile aktive edilmiş JAK/STAT yolağı | 18 |
| Şekil 2.8. Leptin direncinde SOCS proteinlerinin rolü | 19 |
| Şekil 2.9. MAP kinaz aracılı sinyal yolağı | 21 |
| Şekil 2.10. Leptin sinyalinde AMPK yolağı | 22 |
| Şekil 2.11. İnsülin indüklü yollarda leptin sinyali | 23 |
| Şekil 3.1. Leptin genine ait çoğaltılan bölge (77bp) | 31 |
| Şekil 3.2. Leptin reseptör genine ait çoğaltılan bölge (81bp)..... | 31 |
| Şekil 4.1. Real-Time PCR analizi ile, Yakima Yellow ile işaretlenen "A", FAM ile işaretlenen "G" nükleotidlerinin, LEPR genine ait rs3790434 bölgesindeki GG homozigot genotipik dağılımları (ROX: Referans boya) | 35 |
| Şekil 4.2. Real-Time PCR analizi ile, Yakima Yellow ile işaretlenen "A", FAM ile işaretlenen "G" nükleotidlerin, LEPR genine ait rs3790434 bölgesindeki AA homozigot genotipik dağılımları (ROX: Referans boya) | 35 |
| Şekil 4.3. Real-Time PCR analizi ile, Yakima Yellow ile işaretlenen "A", FAM ile işaretlenen "G" nükleotidlerin, LEPR genine ait rs3790434 bölgesindeki GA heterozigot genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya)..... | 36 |
| Şekil 4.4 Real-Time PCR analizi ile, Yakima Yellow ile işaretlenen "A", FAM ile işaretlenen "G" nükleotidlerin, LEPR genine ait rs3790434 bölgesindeki GG homozigot genotipik dağılımları (ROX: Referans boya) | 36 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.5. Real-Time PCR analizi ile, Yakima Yellow ile işaretlenen ‘A’, FAM ile işaretlenen ‘G’ nükleotidlerin, LEP genine ait rs17151919 bölgesindeki genotipik dağılımları (ROX: Referans boya) | 37 |
| Şekil 4.6. Real-Time PCR analizi ile, Yakima Yellow ile işaretlenen ‘A’, FAM ile işaretlenen ‘G’ nükleotidlerin, LEPR genine ait rs3790434 bölgesindeki genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya)..... | 37 |
| Şekil 4.7. LEP geni için hasta ve kontrol gruplarının genotip frekanslarının grafiksel gösterimi | 38 |
| Şekil 4.8. LEPR geni için hasta ve kontrol gruplarının genotip frekanslarının grafiksel gösterimi | 39 |
| Şekil 4.9. LEPR geni için hasta ve kontrol gruplarının genotip frekanslarının grafiksel gösterimi | 41 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 2.1. Fonksiyonel Gastrointestinal Hastalıkların Sınıflandırılması | 3 |
| Çizelge 2.2. İBS Tanısında Kullanılan Manning Kriterleri | 5 |
| Çizelge 2.3. İBS Tanısında Kullanılan Roma I Kriterleri | 5 |
| Çizelge 2.4. Roma II Kriterleri | 6 |
| Çizelge 2.5. Roma III Kriterleri..... | 6 |
| Çizelge 3.1. LEP ve LEPR genlerinin primer dizileri ve PCR sonrası elde edilen bant uzunlukları (bp)..... | 30 |
| Çizelge 3.2. LEP ve LEPR genlerinin prob dizileri | 31 |
| Çizelge 4.1. Kontrol ve hasta gruplarının yaş ortalamaları | 39 |
| Çizelge 4.2. LEP geni için hasta ve kontrol gruplarının genotip frekansı..... | 39 |
| Çizelge 4.3. LEPR geni için hasta ve kontrol gruplarının genotip frekansları | 40 |
| Çizelge 4.4. LEPR (rs3790434) polimorfizmi allel frekansları | 41 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-----------------|--|
| A | Adenin |
| a.a | Amino asit |
| ACC | Asetil CoA Karboksilaz |
| A.B.D | Amerika Birleşik Devletleri |
| AMP | Adenozin Mono Fosfat |
| AMPK | Adenozin Mono Fosfat Bağımlı Protein Kinaz |
| ATP | Adenozin Trifosfat |
| bp | Baz çifti |
| β | Beta |
| cAMP | Siklik Adenin Mono Fosfat |
| cdC | C-5 Propinil Deoksiribo Sitozin |
| cDNA | Komplomentler DNA |
| Cys | Sistein |
| COMT | Katekol-O-metiltransferaz |
| EDTA | Etilendiamintetraasetik asit |
| ERK | Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinazlar |
| FGF2 | Fibroblast Büyüme Faktörü 2 |
| G | Guanin |
| HT | Serotonin |
| İBS | İrritabl Barsak Sendromu |
| İBS-D | Diyare baskın İrritabl Barsak Sendromu |
| İBS-C | Konstipasyon baskın İrritabl Barsak Sendromu |
| İBS-U | Belirlenemeyen tip İrritabl Barsak Sendromu |
| İBS-M | Değişken İrritabl Barsak Sendromu |
| JAK | Janus Kinaz |
| JAK/STAT | Janus Kinaz Sinyal İleti ve Transkripsiyon Aktivatörleri |
| KIR | Kinaz İnhibe Edici Bölge |
| k-Da | Kilo Dalton |

| | |
|---------------------------|---|
| KCl | Potasyum klorür |
| LEP | Leptini Kodlayan Gen |
| LEPR | Leptin Reseptörünü Kodlayan Gen |
| M | Molar |
| MAPK | Mitojen Aktiveleli Protein Kinaz |
| Met | Metiyonin |
| mRNA | Mikro RNA |
| mg | Miligram |
| MgCl₂ | Magnezyum klorür |
| ml | Mililitre |
| Na₂EDTA | Sodyum-2-etilendiamintetraasetik asit |
| NaCl | Sodyum klorür |
| nmol | Nanomol |
| Ob-Ra | Kısa Leptin Reseptör İzofomu |
| Ob-Rb | Uzun Leptin Reseptör İzofomu |
| Ob-Rc | Kısa Leptin Reseptör İzofomu |
| Ob-Rd | Kısa Leptin Reseptör İzofomu |
| Ob-Re | Leptin Reseptör Salgı Formu |
| Ob-Rf | Kısa Leptin Reseptör İzofomu |
| PCR | Polimeraz Zincir Tepkimesi |
| PI3K | Fosfatidilinozitol 3-Kinaz |
| RFLP | Restriksiyon Fragment Uzunluğu Polimorfizmi |
| rpm | Dakikadaki devir sayısı |
| rs | Referans SNP numarası |
| SDS | Sodyum dodesil sülfat |
| SNP | Tek Nükleotid Polimorfizmi |
| SOCS | Sitokin Sinyal İnhibitörleri |
| T | Timin |
| TE | Tris-Etilendiamintetraasetik asit |
| Tris-HCl | Tris-Hidroklorid |
| Tm | Erime Sıcaklığı (Melting Temperature) |
| TYK2 | Tirozin Kinaz 2 |

Val

Valin

UK

Birleşik Krallık (United Kingdom)

VEGF

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖZET

İrritabl Barsak Sendromlu Hastalarda Leptin ve Leptin Reseptör Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması

Fonksiyonel barsak hastalıklarının bir grubunu oluşturan irritabl barsak sendromu (IBS), karın ağrısı ile beraber barsak hareketliliğindeki değişikliklerle karakterize bir hastalıktır. Hastalığın tanı ve tedavisine yönelik biyokimyasal ya da moleküler parametre henüz belirlenememiştir. Leptin ve leptin reseptörleri, JAK/STAT, MAP kinaz, AMP kinaz, ve PI3 kinaz yolaklarında çeşitli hücrelerin proliferasyonunu, yağ asit oksidasyonunu, besin alınımını, vücut ağırlığını, düzenlemektedir. Bu farklı biyolojik işlevleri dikkate alındığında IBS hastalığının moleküler patolojik etiyogenezinde rol alabileceği düşünülmüş, bu nedenle leptin ve leptin reseptörlerindeki fonksiyon kaybına yol açabilecek gen polimorfizmlerinin saptanması ve hastalığın klinik uygulamalarına yön vermesi amaçlanmaktadır.

Çalışmamız, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'nda IBS tanısı konmuş yaş ortalaması 44,3063 olan 159 IBS'li birey ve yaş ortalaması 50,1905 olan 104 sağlıklı birey olmak üzere toplam 263 kişiden oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubuna ait bireylerden alınan kan örneklerinin moleküler analizi, Real-Time PCR (Applied Biosystems) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

Genotiplendirme sonucu elde edilen veriler, SPSS v.11.5 paket programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. LEP (G>A rs17151919) ve LEPR(G>A, rs3790434) polimorfizmlerinin hasta ve kontrol gruplarına ait genotip sıklıkları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ($p>0,05$). Hasta ve kontrol grupları arasındaki allel sıklıkları karşılaştırıldığında ise, allel frekansları açısından kontrol ve hasta grubunu oluşturan bireyler arasında doğrudan bir ilişki görülmedi.

Sonuç olarak; JAK/STAT, MAP kinaz, AMP kinaz ve PI3 kinaz gibi hücre içi yolaklarda görev alan leptin ve leptin reseptör polimorfizmleri ile IBS patogenezi arasında bir ilişki saptanmadı. Leptin ve leptin reseptörüne ait çalışmaya konu olan gen polimorfizmlerinin, irritabl barsak sendromlu bireylerde daha önce çalışılmamış olması nedeniyle, bu çalışmanın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Leptin, Leptin Reseptör, Real-Time PCR

ABSTRACT

The Investigation of Leptin and Leptin Receptor Gene Polimorphisms in Patients with Irritable Bowel Syndrome

Irritable bowel syndrome (IBS) which is a group of functional gastrointestinal diseases, is characterized by chronic or recurrent abdominal pain with disturbed bowel habits. There is still not a biochemical or molecular parameter in diagnosis and treatment of IBS. Leptin and leptin receptors regulate the proliferation of various cells, oxidation of fat acid, food intake, body weight via JAK/STAT, MAP kinase, AMP kinase, PI3 kinase pathways. Leptin can act on the molecular pathologic aetiopathogenesis of IBS. Thus, in our study, detection of polymorphisms in leptin and leptin receptor which cause function lost in gene and associated with IBS is aimed.

Our study's sample volume is including the average age 44,3063 of 159 individuals have taken IBS diagnosis as experimental group and 104 healthy individuals with the average age is 50,1905, for a total of about 263 people at Mersin University Medical Faculty Gastroenterology Department. The molecular analysis of the blood samples which have taken from both experimental and healthy group, was performed by using Real-Time PCR (Applied Biosystems) method.

Data from genotyping, was evaluated statistically by SPSS v.11.5 packet program. It has detected not to be meaningful difference in genotype frequency between healthy and patient people of LEP (G>A rs17151919) ve LEPR(G>A, rs3790434) polymorphisms ($p>0,05$). When it is compared allele frequency between healthy and patient group, there was not an direct association between healthy people and patients.

As a result, there was not an association between leptin and leptin receptor which act intracellular signal pathways like MAP kinase, JAK/STAT, AMP kinase, PI3 kinase, polymorphisms and IBS. This study is thought to be a guide for other studies about this subject because this is the first study inspects polymorphism genes in IBS patients.

Key words: Leptin, Leptin Receptors, Real-Time, IBS,

1.GİRİŞ

İlk kez 1818'de Powel tarafından klinik olarak tanımlanan İrritabl Barsak Sendromu (İBS), herhangi bir neden olmaksızın, abdominal ağrı, karın şişliği ve barsak hareketlerinin değişimi ile kendini gösteren bir hastalıktır. Abdominal ağrı ve yorgunluğa neden olması İBS'li bireylerin çalışma hayatını olumsuz etkilemektedir (1).

İBS, dünyada genel populasyonun %7-10'unu etkileyen en yaygın barsak hastalığıdır (2). Genç bireylerde ve kadınlarda daha sık görülmektedir. Sendrom, baskın semptomlara göre sınıflandırılmaktadır:

- İshal baskın ise İBS-D
- Kabızlık baskın ise İBS-C
- Karma tip İBS-M (veya A)
- Belirlenemeyen tip (İBS-U)

Bununla birlikte semptomlar zamanla değişebilen bir seyir izleyebilmekte hatta 2,5 aylık bir zaman aralığında bile kaybolabilmektedir (3).

İBS'nin altında yatan mekanizma henüz aydınlatılamamıştır. Ailesel agregasyon ve ikiz çalışmalarından elde edilen veriler, İBS gelişiminde genetik bir mekanizmanın rol oynayabileceğini göstermiş ancak yine de bu mekanizmanın ne olduğu henüz gösterilememiştir. Çevresel faktörlerin etkisi de henüz saptanamamıştır (1).

Adipoz dokudan salgılanan leptin, ilk kez obezite ile ilgili bir protein olarak tanımlanmış olup, besin alınımı ve enerji homeostazında önemli işlevlere sahiptir. Leptin, ilk olarak 1994'te Zhang ve arkadaşları tarafından obez farelerden klonlanarak elde edildi. Leptin kodlayan gen 7q31.3'de lokalizedir ve 3 ekzon ve 2 introndan oluşmaktadır (4). Leptin, hematopoez, anjiyogenez, kan basıncının düzenlenmesi, lenfoid organ homeostazı ve T-lenfosit immün yanıtında görevli olup işlevini leptin reseptörleri aracılığı ile yürütmektedir.

Leptin reseptörü ise 1p31'de lokalize bir gen tarafından kodlanmaktadır. En az 6 leptin reseptör varyasyonu veya izoformu tanımlanmıştır (OBRa, OBRb, OBRc, OBRd, OBRe, OBRf). Bu izoformlar, alternatif mRNA splicing nedeniyle uzunlukları değişen homolog ekstraselüler domainlere ve farklı intraselüler domainlere sahiptirler. Leptin reseptörlerinin aktivasyonu, birkaç farklı sinyal ileti yollarının tetiklenmesine neden

olmaktadır (5,6). Bu yollar arasında en iyi çalışılmış olanı, JAK/STAT yolağıdır (7). Bu yolak, enerji homeostazında ve nöroendokrin fonksiyonda kritik roller oynamaktadır. Leptinin leptin reseptörüne bağlanması, JAK'ların fosforilasyonu ve aktivasyonunu sağlar. Aktive olmuş JAK'lar hızlı bir şekilde Ob-Rb sitoplazmik domainlerindeki tirozin rezidülerini fosforile eder. Bazı fosforile edilmiş rezidüller, STAT3 aile üyelerini de kapsayan sinyal molekülleri için bağlanma bölgesi oluştururlar. STAT'lar fosforile olduktan sonra spesifik hedef genlerin transkripsiyonu için nukleusa transloke olurlar (8). Leptin sinyali, JAK/STAT sinyal kaskadını inhibe eden protein ailesinin bir üyesi olan sitokin sinyal baskılayıcıları (SOCS-3) tarafından sonlandırılır. SOCS proteinleri, sitokinler tarafından uyarılır ve reseptörün çalışmasını inhibe ederler (9).

MAP kinaz yolağı ise Ob-Ra ve Ob-Rb reseptörleriyle stimüle edilmektedir. Osteoblastik prekürsör hücrelerde leptinin, MAPK sinyal yolu aracılığıyla apoptozu indüklediği bilinmektedir. Leptinin yağ asit oksidasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir. Leptin tarafından uyarılan AMPK (Adenin Mono Fosfat bağımlı protein kinaz yolağı), hipotalamusta hormonal ve beslenme sinyallerine yanıt vererek besin alımını düzenlemektedir (6).

Leptin ve leptin reseptörlerinin hücresel düzeydeki fizyolojik işlevleri ve moleküler etkileşimleri dikkate alındığında birçok hastalığın moleküler etiyopatogenezinde bozulmuş işlevsel/yapısal katkılarının olabileceği düşünülmektedir. Bu araştırmada İBS'de leptin (rs17151919) ve leptin reseptör (rs3790434) gen polimorfizmleri araştırıldı. İBS'de daha önce çalışılmamış olan bu gen polimorfizmlerinin hastalığın patogenezine ve literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2.GENEL BİLGİ

2.1.İrritabl Barsak Sendromu:

İrritabl Barsak Sendromu (İBS) klinik olarak 1940'larda tanımlanmış olmasına rağmen İBS benzeri semptomlar içeren hasta raporlarına 1818'de de rastlanılmaktadır (10). Tarihsel süreç içerisinde hastalık, spastik kolon, mukus kolit veya nörojenik kolit olarak da adlandırılmaktadır (1,11). Roma III kriterlerine göre fonksiyonel gastrointestinal hastalıklar (Çizelge 2.1) arasında gösterilen İBS, defekasyonla ilişkili olarak abdominal ağrı veya rahatsızlık ve barsak hareketlerinde değişikliklerle karakterize edilen önemli bir sağlık sorunudur (12). Fonksiyonel bir barsak hastalığı olan İBS, orta veya aşağı gastrointestinal boşlukta kendini gösteren semptomlarla karakterize edilir. İBS'nin genel semptomları; fonksiyonel abdominal distansiyon, fonksiyonel konstipasyon, fonksiyonel diyare, barsak fonksiyonlarının değişimi, karın şişliği, tam olarak boşalamama hissi, mukus geçişinin artması ve belirlenemeyen fonksiyonel barsak hareketleridir (13).

Çizelge 2.1. Fonksiyonel Gastrointestinal Hastalıkların Sınıflandırılması (12)

| Fonksiyonel Gastrointestinal Hastalıklar |
|--|
| A. Fonksiyonel özofajiyel hastalıklar |
| B. Fonksiyonel gastroduodenal hastalıklar |
| C. Fonksiyonel barsak hastalıkları |
| D. Fonksiyonel abdominal ağrı |
| E. Fonksiyonel biliyer hastalıkları |
| F. Fonksiyonel anorektal hastalıklar |
| G. Fonksiyonel hastalıklar: Yeni doğan bebeklerde |
| H. Fonksiyonel hastalıklar: Çocuk ve yetişkinlerde |

Bunlara ilaveten, uyusukluk, uykusuzluk, fibromiyalji, sırt ağrısı, idrar sıklığı ve disparüni gibi gastroenterolojik olmayan semptomlar da İBS'li hastalarda sıklıkla

gözlenir. Ayrıca, İBS hastalarında anksiyete ve depresyon da gözlenmekte ancak bu bulgular, İBS ile diğer barsak hastalıklarını ayırt edici bir kriter olarak kullanılmamaktadır (14).

İBS semptomları zamanla değişiklik göstermektedir. Kısa bir zaman diliminde bile semptomlar kaybolabilmektedir. İBS semptomlarının %38-50'sinin birinci yıl sonunda kaybolduğu rapor edilmiştir. İBS'li hastaların endişelerinden biri ise ikincil bir hastalık gelişme riskini taşımalarıdır. UK (United Kingdom) veri tabanında, İBS'li hastaların %1'inin kansere yakalanma riski olduğu belirtilmektedir (3). İBS'li bireyler semptomlar nedeniyle günlük fonksiyonlarını yerine getirme, işe gitme konularında da güçlük çekerler. Bu nedenle, hastalık bireyler üzerinde olumsuz etki yaratmaktadır (15).

2.1.1. İBS Epidemiyolojisi:

İBS hastalığının tanısında kullanılan herhangi yapısal ya da biyokimyasal bir belirteç kullanılmamaktadır. Bu nedenle hastalığın tanısında ve ayrıca önemli araştırmalarda çeşitli tanı kriterleri kullanılmaktadır. Hastalığın görülme sıklığı tanı kriterlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (16,17). Bununla birlikte İBS, genel popülasyonun %3-20'sini etkilemektedir. A.B.D ve İngiltere'de yapılan çalışmalarda, erkeklerde hastalığın prevalansı %5-19, kadınlarda ise %7-24 arasında değişiklik göstermektedir. Prevalans tespitinde çoğunlukla *Manning* kriterleri kullanılmakla birlikte ülkemizde Roma II kriterlerine bağlı olarak İBS prevalansı %6,3-10 arasındadır. İBS'nin prevalansı, Asya'da %1-23, Brezilya'da % 9, Avrupa'da ise %19'dur (17,18).

Her iki cinsiyette de görülmeyle birlikte, hastalık ağırlıklı olarak kadınları etkilemektedir. Hastalıktan etkilenen bireylerin %60-75'lik kısmını kadınlar oluşturmaktadır. Ek olarak, genç bireylerin bu hastalığa yakalanma riski yaşlı bireylere oranla daha yüksektir. İBS prevalansı yaş arttıkça azalmaktadır. 20-50'li yaşlarda sık gözlenmekle birlikte çocuklarda da görülebilir. 50 yaş üstünde ise nadirdir (19).

A.B.D'de yapılan bir araştırmaya göre, İBS'li bireylerin sadece %10'u semptomlar nedeniyle hastaneye başvurmaktadır. 65-93 yaş arası bireyler arasında İBS prevalansı %10,9 iken, 30-64 yaş arası bireylerde ise %17 olarak saptanmıştır (17).

2.1.2. İBS Tanısı:

İrritabl Barsak Sendromu'nun tanısında kullanılan herhangi bir biyolojik marker söz konusu değildir. Bu nedenle tanı, semptomlara dayalı olarak konulmaktadır (20). İlk olarak Manning ve arkadaşları (1978) tarafından, abdominal ağrı ve dışkı görünüşüne göre tanı kriterleri belirlenmiştir (Çizelge 2.2). Sonraki yıllarda ise, tüm gastrointestinal barsak hastalıkları için bu tanı kriterleri daha da geliştirilmiş ve 1991 yılında Roma I kriterleri kullanılmaya başlanmıştır. Roma I kriterlerinin (Çizelge 2.3) kompleks olması ve kullanımının zor olması nedeniyle bu kriterler tekrar gözden geçirilmiştir. 1999'da oluşturulan Roma II kriterleri ise daha basit, aynı zamanda dışkı formundan daha çok abdominal ağrı üzerine odaklı kriterlerdir (Çizelge 2.4). Son olarak 2006'da Los Angeles, Kaliforniya'da tanı kriterlerinin son şekli Roma III kriterleri olarak bir sempozyumda sunulmuştur (20,21)(Çizelge 2.5).

Çizelge 2.2. İBS Tanısında Kullanılan Manning Kriterleri (20)

| Manning Kriterleri | |
|---------------------------|---|
| 1 | Dışkılama sonrası ağrının hafiflemesi |
| 2 | Ağrının ortaya çıkması ile dışkının gevşemesi |
| 3 | Ağrının ortaya çıkması ile daha sık dışkılama |
| 4 | Abdominal distansiyon |
| 5 | Mukus geçişi |
| 6 | Tam boşalamama hissi |

Çizelge 2.3. İBS Tanısında Kullanılan Roma I Kriterleri (20)

| Rome I Kriterleri | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Karın ağrısı veya rahatsızlık hissi• Defekasyonla geçen ağrı• Dışkılama sıklığında değişiklik• Dışkının kıvamında değişiklik | En az 12 hafta boyunca semptomların devamlı ya da tekrar edici olması |
| <ul style="list-style-type: none">• Dışkının frekansındaki değişiklik• Dışkının şeklindeki değişiklik• Dışkı geçişinde değişiklik• Mukus geçişi• Şişkinlik ve abdominal distansiyon hissi | Hastalık süresi veya günlerinin en az ¼'ünde semptomlardan iki veya daha fazlasının bulunması |

Çizelge 2.4. Roma II Kriterleri: (20)

| Rome II Kriterleri | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Dışkılama ile geçen rahatsızlık hissi• Dışkının sıklığındaki değişiklik• Dışkının görünümündeki değişiklik | Son 12 ay boyunca (ardışık olması şart değil) en az 12 hafta süresince yandaki üç bulgudan ikisinin bulunması |

Çizelge 2.5. Roma III Kriterleri: (20)

| Rome III Kriterleri | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Dışkının sıklığındaki değişimle ilişkili olarak ağrı başlangıcı• Dışkının şeklindeki değişimle ilişkili olarak ağrı başlangıcı• Dışkılama ile ağrının ortadan kaybolması | Son 3 ay içerisinde ayda en az üç gün iki veya daha fazla durumun karın ağrısı veya rahatsızlık ile birlikte olması |

Roma III kriterlerinde Roma II kriterlerinden farklı olarak şu ana değişiklikler mevcuttur:

1. Semptomlar için bir sıklık basamağının belirlenmesi (örneğin son 3 ayda her ay için 3 ya da daha fazla günde)
2. İBS alt tiplerinin yeniden düzenlenmesi
3. Roma II kriterlerinde alt tipler dışkı sıklığı, dışkı şekline dayandırılırken, Roma III kriterlerinde ise alt sınıflama yalnızca dışkı yoğunluğuna dayandırılarak düzenlenmiştir (22,23).

Manning kriterleri, epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Roma I ve Roma II kriterleri ise İBS'nin tanı ve tedavi çalışmalarına hasta katmada ortak bir kriter kullanımı için geliştirilmişlerdir. Son yıllarda ise klinik uygulamada kullanımı yaygınlaşmıştır (20).

2.1.3. Hastalığın Sınıflandırılması:

İrritabl Barsak Sendromu, baskın semptomlara göre sınıflandırılmaktadır. Dışkılama değişiklikleri göz önüne alınarak diyare predominant, konstipasyon predominant ve değişken olarak gruplandırılmaktadır. Roma II kriterlerinde belirtilen destekleyici semptomların varlığı, İBS alt tiplerinin sınıflandırılmasında da kullanılmaktadır. Aşağıda verilen semptomların bir veya birkaçının birlikte bulunması veya bulunmamasına göre İBS alt gruplara ayrılmaktadır (14,24).

2.1.3.1. Alt Grupların Sınıflandırılmasında Kullanılan Semptomlar :

1. Haftada 3'den az dışkılama
2. Günde 3'den fazla dışkılama
3. Sert veya topaklar halinde dışkılama
4. Peltemsi veya sulu dışkılama
5. Dışkılama sırasında zorlanma
6. Ani dışkılama
7. Tam boşalamama hissi
8. Dışkılama esnasında mukus geçişi
9. Abdominal distansiyon

2,4 veya 6'daki semptomlardan bir veya daha fazlasının olması ve 1,3 ve 5'teki semptomlardan hiçbirinin olmaması durumunda İBS-D ön plandadır. 1,3 veya 5'teki semptomlardan bir veya daha fazlası ve 2,4 veya 6 semptomlarının hiçbirinin olmaması durumunda ise İBS-C ön plandadır. Diyare semptomlarının (semptom 2,4 ve 6) ve konstipasyon semptomlarından (semptom 1,3 ve 5) en az birinin bulunduğu durumda ise İBS-A ön plandadır. Bu kriterlerden herhangi biri görülmediği durumlarda barsak hareketleri normal olarak değerlendirilir (14,25).

Önerilen yeni alt sınıflama içinde kabızlıkla birlikte olan İBS (İBS-C), diyare ile birlikte olan İBS (İBS-D), karma tip İBS (İBS-M) ve alt sınıfı olmayan İBS (İBS-U) yer almaktadır. İBS-M'li hastaların saatler veya günler süren aralıklarla hem katı hem de gevşek dışkılamaları olmaktadır (22,25).

2.1.4. Hastalığın Patofizyolojisi:

İBS, patofizyolojik olarak gastrointestinal motor aktivitesi, visseral duyarlılık veya merkezi sinir sistemindeki iletişim bozukluğu ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (26). Ayrıca, çocuk yaşantılar, daha sonraki psikososyal yaşantılar semptomların oluşumuna katkıda bulunarak İBS gelişimini etkilemektedirler. Gastrointestinal boşlukta gelişen enfeksiyonlardan sonra da İBS gelişebilmektedir. Bunlara ek olarak genetik faktörlerin de ağrı uyaranlarını etkileyerek İBS gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (14,27) (Şekil 2.1).

Sık rastlanılan bir hastalık olmasına karşın, İBS semptomlarının altında yatan mekanizma henüz aydınlatılamamıştır (28). İBS'nin altında yatan mekanizma tam olarak aydınlatılamamasına karşın bu konuda çeşitli hipotezler vardır:

2.1.4.1. Bozulmuş Motilite:

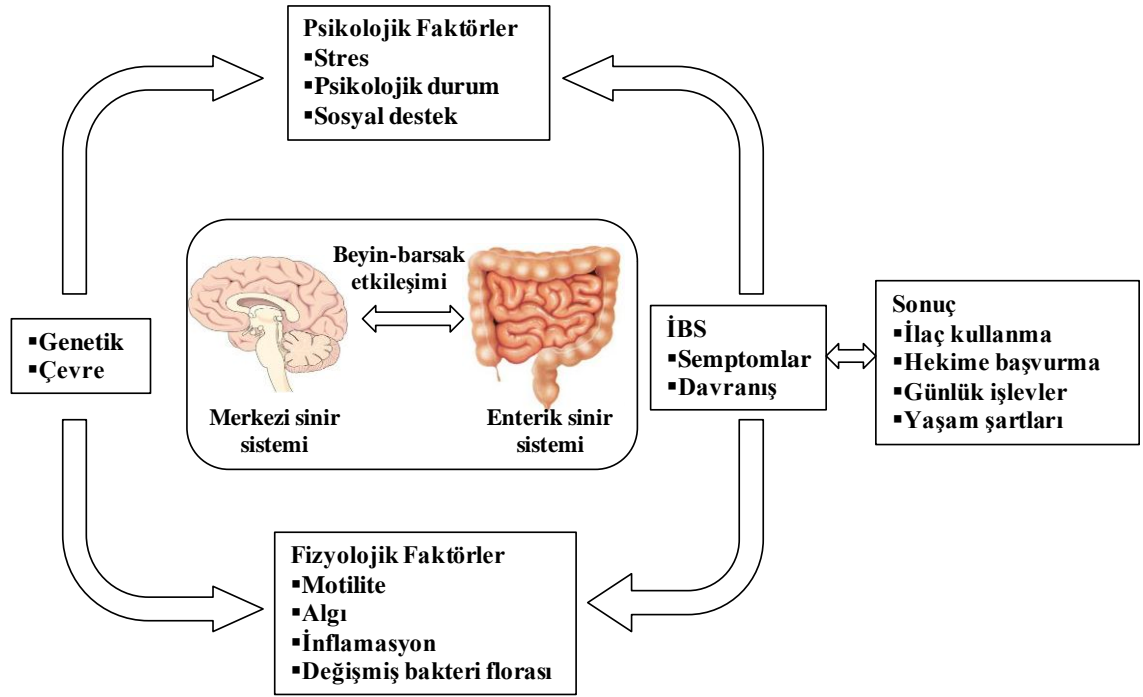
Sağlıklı bireylerde, aşırı duygusallık ve çevresel stres, özofagus, mide, ince barsak ve kolonda motilitenin artışına neden olabilir. Fonksiyonel gastrointestinal hastalığı olan bireyler, normal bireylerle kıyaslandığında psikolojik veya fizyolojik streslere yanıtta daha büyük bir motilite cevabı oluştururlar. Bu motor cevaplar, kısmen barsak semptomları ile ilişkilendirilirler. Abdominal hareketlilik barsaklardaki geçiş, diyare ve konstipasyon da değişikliklere sebebiyet verirse, barsak motilitesindeki değişiklikler sadece acıya değil aynı zamanda karın şişliğine de neden olabilmektedir (13,22).

2.1.4.2. Visseral Duyarlılık:

Visseral duyarlılık İBS ve diğer fonksiyonel gastrointestinal hastalıklarda en sık görülen patofizyolojik değişimlerdir. Abdominal ağrı, İBS tanımlanmasında oldukça önemlidir. Yıllardır, İBS hastalarında hastalığın karakteristik özelliği olan kronik abdominal ağrıya neden olan etken bulunamamıştır. Son zamanlarda yapılan birçok çalışma, İBS'li hastaların gastrointestinal boşlukta meydana gelen acıya karşı hassas olduklarını gösterdi (29,30). İBS'nin sağlıklı bireylerin algılayamadığı normal fizyolojik olayların bile algılanmasına yol açan visseral afferentlerin duyarlılığındaki artıştan kaynaklandığı öne sürülmüştür (27).

2.1.4.3. Psikososyal Faktörler:

Psikososyal faktörlerin İBS'ye neden olduğu düşünülmemekle birlikte bazı hastalarda etkisinin görüldüğü ileri sürülmektedir. Psikolojik stres ve duygusallık tüm bireylerde gastrointestinal semptomlar oluşturur fakat İBS hastalarında semptomların şiddeti giderek artmaktadır. Depresyon, somatizasyon, panik hastalığı, anksiyete bu hastalarda yaygın görülmektedir (11,31).



Şekil 2.1. Genetik ve psikolojik faktörler ile daha sonra gelişen irritabl barsak sendromu arasındaki kuramsal ilişki (14).

2.1.4.4. Nörotransmitter Dengesizliği:

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, İBS ve diğer gastrointestinal hastalıkların beyin-sindirim sistemi düzensizliğinden kaynaklanabileceğini ileri sürmektedir. Enterik sinir sistemi yarı-otonom işlev görür: düz kaslar, endokrin hücreler ve kan damarları gibi efektör sistemlerden gelen sinyallere yanıt verir. Çeşitli nörotransmitterler ve nöropeptidler hem beyinde hem de barsakta bulunur. Gastrointestinal homeostazis, bu nörotransmitter ve nöropeptidlerin sekresyon ve motilitesini arttıran ya da inhibe eden

yolaklar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu dengenin bozulması İBS semptomlarının ortaya çıkmasına neden olur (32,33).

Serotonerjik yollar, İBS patofizyolojisi ve beyin-barsak bozukluğunun aydınlatılmasında odak noktası haline gelmiştir. Serotonin(5-HT), enterik sinir sistemi ve beyin-sindirim sistemi aksında önemli bir nöropeptittir ve gastrointestinal boşluktaki birçok fonksiyon için gereklidir (34). Serotoninin %95'inden fazlası gastrointestinal boşlukta özellikle mide-barsak mukozasında yer alan enterokromaffin hücrelerde ve aynı zamanda nöronal ve mast hücrelerinde de bulunur. İntralüminal stimülasyon enterokromaffin hücrelerinden intrinsik ve ekstrinsik afferent nöronlarda yer alan reseptörlere bağlanan 5-HT salınımını artırır. 5-HT₃ reseptör alt tipinin aktivasyonu motilite, sekresyon ve duyarlılıkta artışa neden olur (35).

2.1.4.5. Genetik Faktörler:

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, birçok genetik faktörün İBS'nin klinik belirtileri ve etiolojisinde rol oynayabileceğini ileri sürmektedir. Genetik faktörlerin hastalık üzerindeki etkisini değerlendirebilmek için gen polimorfizmlerine dayalı, ailesel agregasyon, ikiz çalışmaları ve genetik epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır (37).

Whorwell ve ark.(1986) yaptığı çalışmada, İBS'nin 2 jenerasyonu kapsayabileceğini gösterdi. Bu çalışmaya göre, 100 İBS'li hastadan %33'ünün İBS aile öyküsüne sahip olduğu, kontrol grubunda ise bu oranın %2 olduğu saptanmıştır (38).

Bellentani ve ark.(1990) sürekli karın ağrısı çeken hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, hastalığın birinci derece hasta yakınlarında da gözlemlendiğini saptadı. Bu iki çalışma, ailede İBS öyküsüne sahip bir birey varsa, ailenin diğer bireylerinde de İBS gelişim riskinin giderek arttığını ileri sürmektedir (39,40).

Amerika'da 643 bireyde yapılan bir diğer çalışmada ise, ailesinde abdominal ağrı veya barsak rahatsızlıkları bulunan hastalarda İBS gelişimi açısından risk faktörlerinin giderek arttığı gözlemlenmiştir. Bu risk, genetik faktörler, çevresel etmenler veya her ikisi ile birlikte değerlendirilmektedir (41).

Japonya’da, İBS hastaları ve kontrol grubu üzerine yapılan bir çalışma, kontrol grubuna oranla İBS’li hastaların pozitif bir aile öyküsüne sahip olduğunu göstermiştir. Aile öyküsü, sindirim güçlüğü, diyare, konstipasyon ve anksiyeteyi içeren klinik belirtiler ile ilişkilendirilmiştir (42).

İBS’nin gelişiminde genetik faktörlerin etkilerini araştırmak için birçok ikiz çalışmaları yapılmıştır (38).

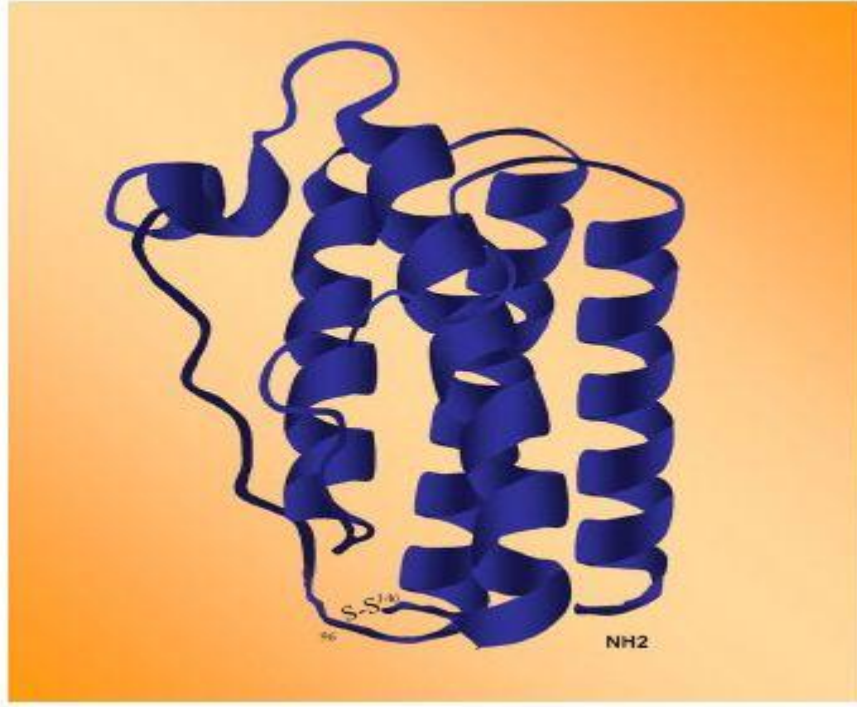
Avustralya’da 343 ikizden oluşan örneklem üzerinde yürütülen bir çalışmada, İBS tanısının monozigotik ikizlerde %33 oranında ortak olduğu bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda, risk varyansının %56,9’luk bölümünü genetik faktörlerin oluşturması, genetik faktörlerle İBS arasında önemli bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Bu konuda yürütülmüş bir başka önemli çalışmada, 986 ikiz çift İBS tanısı açısından değerlendirilmiş ve monozigotik ikizlerde genetik varyansının %22 olduğu saptanmıştır (43).

2.2. Leptin

2.2.1. Leptinin Biyolojisi ve Yapısı:

Leptin, beyaz adipoz dokudan sentezlenen ve salgılanan sitokin benzeri bir hormondur. 167 aminoasit uzunluğunda ve 16 kDa molekül ağırlığındadır. İlk olarak Zhang ve ark.(1994) tarafından pozisyonel klonlama yöntemiyle elde edilen leptinin öncelikli görevi; besin alınımı ve enerji metabolizmasının düzenlenmesidir (44,45). Başlangıçta tokluk faktörü olarak tanımlanmış olan leptinin, başta hipotalamus olmak üzere kalp, plasenta, akciğer, karaciğer, kas, böbrekler, plasenta, dalak, timus, prostat, testisler, over, ince barsak ve kolonda reseptörlerinin gösterilmesiyle sadece enerji regülasyonunda rol almadığı, vücudun birçok sisteminin fonksiyonlarının düzenlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (46).

Imagava ve ark.(1998) yaptıkları in vitro ve in vivo çalışmalarda, biyolojik işlev ve reseptöre bağlanma aktivitesi bakımından 3 farklı leptin yapısı olduğunu saptadılar. Yine yapılan çalışmalar sonucunda N-terminal a.a sekansının (22-115) leptinin biyolojik ve reseptöre bağlanma aktivitesinden sorumlu olduğunu, C-terminal a.a sekansının (116-166) ise, N-terminal bölgesinin aktivitesinin düzenlenmesinde önemli olduğu ve C-terminalinde yer alan disülfür köprüsünün ise, leptinin aktivitesinde gerekli olmadığı saptanmıştır. Leptin proteini, 4 alfa heliks ve 2 beta kırılmalı tabaka içerir ve tek disülfür bağı (Cys 96-Cys146) ile birarada tutulur (Şekil 2.2). Leptin proteini aminoasit sekansının türler arasında % 67 oranında korunduğu gözlenmiştir (44,47,48).

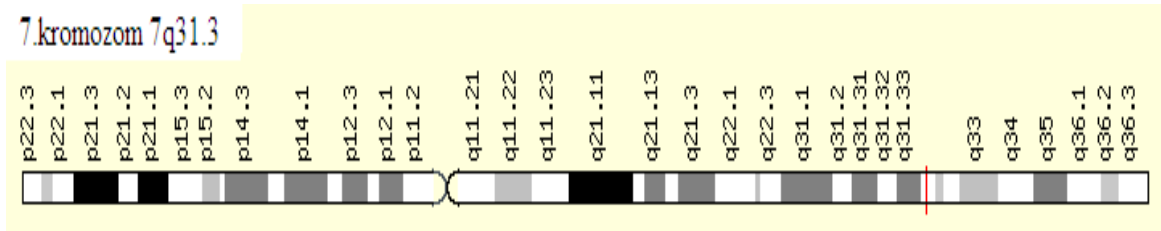


Şekil 2.2. Leptin proteinin helikal loop yapısı (54)

Leptin hedef dokudaki biyolojik aktivitelerini leptin reseptör aracılığı ile gerçekleştirmektedir (49).

2.2.2. Leptin Geni:

Leptini kodlayan gen (LEP), insanlarda 7q31.3 kromozom bölgesinde lokalize olup, 2 intron ve 3 ekzondan oluşmaktadır (Şekil 2.3). Uzunluğu yaklaşık 1500 bp'dir (50). İnsan leptin geni 3.5 kb cDNA kodlamaktadır. Kodlama yapan bölge ekzon 2 ve 3'ü içerirken ekzon 1 proteine çevrilmez. Ekzon 2'nin ilk kısmı, olgun leptin proteininde bulunmayan 21 a.a'lık bir sinyal proteini kodlamaktadır (44).



Şekil 2.3. İnsan leptin geninin kromozom 7q31.3'deki lokalizasyonu (51)

Leptin gen transkripsiyonunu anlamak için leptin promotör bölgesi izole edilip karakterize edilmiştir. Leptinin promotör bölgesi 3 kb uzunluğundadır ve TATA kutusu genin 26-30 nükleotid up-stream bölgesinde yer almaktadır (52).

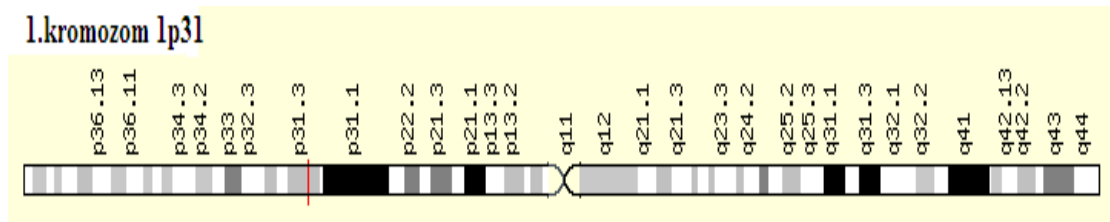
Şu ana kadar insan leptin promotör bölgesinde birçok önemli transkripsiyon faktörünün bağlandığı domainler tanımlanmıştır. CCATT/enhancer bağlayıcı proteinler, cAMP response element bağlayıcı proteinleri bağlayıcı domainlerdir. CCATT/enhancer bağlayıcı protein, adipoz dokuda ve enerji metabolizmasında yer alan birçok genin transkripsiyonunda görev alan bir transkripsiyon faktörüdür (44,53).

LEP genini etkileyen 2 tip mutasyon leptin proteinin yapısında değişiklik meydana getirebilir: İlki, kısa ve fonksiyonel olmayan protein oluşumu ile sonuçlanan, stop kodon oluşumuna yol açan bir non-sense mutasyon ve diğeri ise, transkripsiyonu bozan ve böylece protein oluşumuna izin vermeyen bir mutasyondur (52,54).

2.3. Leptin Reseptörleri

2.3.1. İzoform ve yapısı:

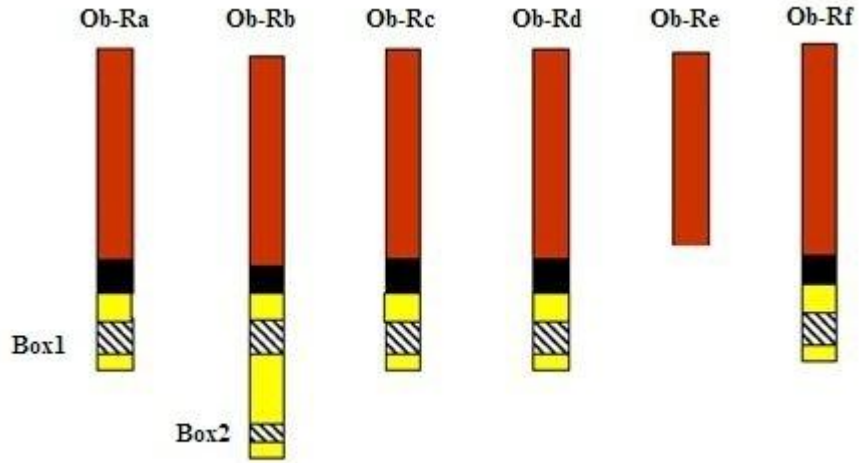
Leptin, ilk olarak koroid pleksus ve hipotalamusta tanımlanan leptin reseptör aracılığı ile hücrel işlevini yerine getirmektedir. Leptin reseptör ürününü kodlayan gen kromozom 1p31'te lokalizedir (55)(Şekil 2.4).



Şekil 2.4. İnsan leptin reseptör geninin kromozom 1p31'deki lokalizasyonu (56)

Leptin reseptörü, IL-2,IL-3,IL-4,IL-6,IL-7, granüosit stimüle edici faktör, büyüme hormonu, prolaktin ve eritropoetin reseptörlerini de kapsayan sınıf I sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olup, değişik alternatif formlarda üretilmektedir. En az 6 leptin reseptör izoformu tanımlanmaktadır (54,57). Leptin reseptörleri yaklaşık 800 a.a rezidüsü uzunluğunda ektraseüler domainlere, 34 a.a rezidünlük transmembran domaini ve değişken uzunlukta intrasellüler domainlere sahip olması nedeniyle kısa, uzun ve salgı formu olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır:

- Uzun form (OB-Rb)
- Kısa form (OB-Ra,c,d,f)
- Salgı formu (OB-Re)



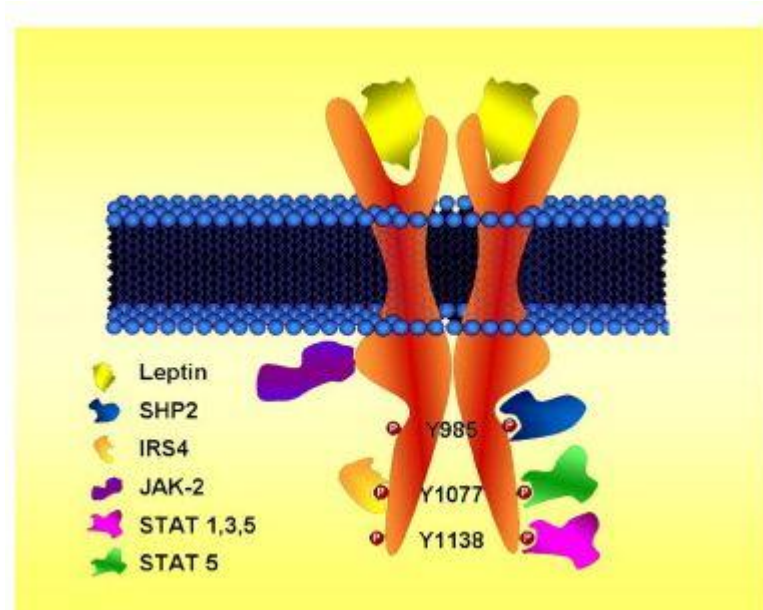
Şekil 2.5. Leptin reseptör gen izoformları (57)

Leptin reseptörünün uzun formu (OB-Rb), en uzun intrasellüler domaine sahipken (yaklaşık 300 a.a), OB-Ra,c,d ve f kısa intrasellüler domainlere (32-40 a.a) sahiptir. Uzun ve kısa leptin reseptör izoformlarının intrasellüler domainleri, 29 a.a uzunluğunda, Janus kinaz (JAK) bağlanma domaini olan 'Box1' domainine sahipken, OB-Rb, bu domaine ek olarak 'Box2' ve STAT proteinleri için bağlanma bölgeleri de içermektedir (45)(Şekil 2.5).

Leptin reseptör izoformları, hipofiz bezi, üreme organları, meme bezleri, immün sistem, sindirim sistemi, böbrek ve akciğerlerde eksprese edilmektedir. Uzun form, insan ve rat beyninin çeşitli kısımlarında yüksek oranda eksprese edilir. Uzun form,

mRNA'sı hipotalamus dışında serebelumun granüler hücre tabakalarında daha az oranda eksprese edilmektedir. Pankreatik β hücrelerinde de eksprese edilir ve leptin tarafından insülin sekresyonunun inhibisyonuna katkıda bulunur. Bu nedenle, beynin enerji dengesinin kontrolü ile ilgili kısımları leptinin hedef bölgeleridir (54,58). Uzun form, sinyal izoformu olarak tanımlanmasına rağmen kısa reseptör izoformlarının da sinyalde görev alabileceği ve farklı sinyal kapasitesine sahip oldukları gösterilmiştir. Kısa leptin reseptör izoformu olan OB-Ra, koroid pleksus ve kılcacık damarlarında yüksek seviyede eksprese olurken, beyinde daha az eksprese olmaktadır. Bu kısa leptin reseptör izoformu, leptinin kan beyin bariyerini aşarak beyne ulaşmasında önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Salgı formu olan OB-Re ise, leptinin biyolojik aktivitesinde rol oynamaktadır (59).

Her iki leptin reseptör izoformu da ligand yokken homodimer yapısındadır. Leptin reseptörleri arasında dimer oluşumu sinyalizasyon için gereklidir. Uzun leptin izoformu leptin ile etkileşime girdiğinde tetramerik reseptör-ligand kompleksi oluşmaktadır (45)(Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Leptin dimerizasyonu(45)

2.3.2. Leptin Reseptör Geni:

Leptin reseptör geni 70 kb uzunluğunda olup 20 ekzon içermektedir. 1. ve 2. ekzon protein kodlamaz ancak birçok alternatif leptin reseptör yapının oluşumundan sorumludur. Ekzon 1, %70 GC içeriğine sahiptir ve 8 bp'lik palindromlardan

oluşmaktadır. Ekzon 3 ise, başlangıç kodunu ve aynı zamanda ekzon 4'te de yer alan sinyal sekansına sahiptir. Ekzon 20, en uzun ekzon olup 900 nükleotid uzunlukta ve leptin reseptörünün son 270 a.a'lık kısmını kodlamaktadır (60).

Leptin reseptör geninde birçok mutasyon saptanmıştır. Leptin reseptör genindeki herhangi bir mutasyon defektif sinyal transdüksiyonuna ve böylece hedef dokuda leptinin görevini tam olarak yerine getirememesine neden olabilmektedir. Bu mutasyonların çoğu, erken obezite başlangıcı, hiperfaji ve infertilite ile sonuçlanmaktadır (61).

2.4. Hücre İçi Leptin Sinyal Yolakları:

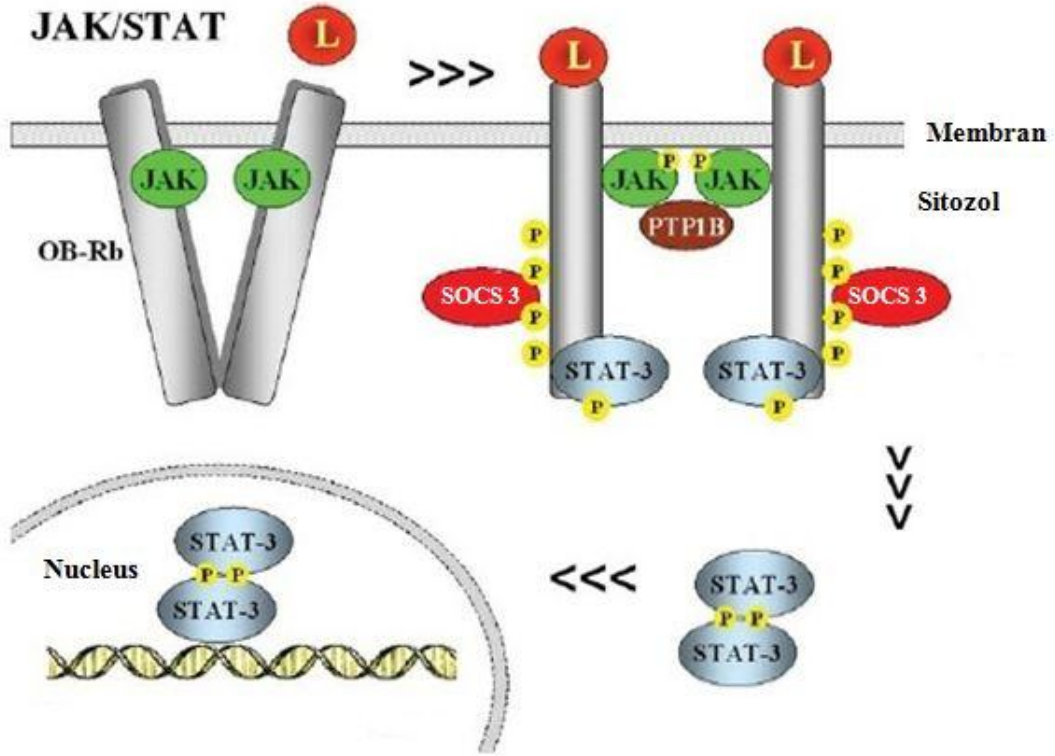
Son yıllarda, leptinin leptin reseptörüne bağlanmasıyla gerçekleşen sinyal mekanizmaları, leptin fonksiyonunun moleküler ve biyokimyasal mekanizmasının daha iyi bir şekilde anlaşılmasına olanak sağlamıştır (6). Uzun leptin reseptör formunun sınıf I sitokin ailesi ile homoloji göstermesi, leptinin JAK ve STAT'ların aktivasyonunu da kapsayan sitokin reseptör benzeri sinyallerde rol alabileceği olasılığını akla getirmiştir. Böylece sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olarak uzun leptin reseptör formunun keşfedilmesi sonucunda, leptin tarafından aktive edilen başlıca sinyal yolaklarından biri olan JAK/STAT yolağı tanımlanmıştır. OB-Ra ve OB-Rb reseptör heterodimerleri JAK/STAT yolağını aktive edemezken, OB-Rb, JAK'ların aktivasyonunu sağlamaktadır. Leptinlerin ayrıca MAPK, cAMP, ve PI3K yolaklarını da aktive ettiği daha sonraki yıllarda tanımlanmıştır (54,62).

2.4.1. Janus Kinaz Sinyal İleti ve Transkripsiyon Aktivatörleri (JAK/STAT)

Yolağı:

JAK/STAT sinyal yolağı, çoğu sitokin ve büyüme faktörlerinin hücrel işlevlerini göstermelerinde önemli rol oynamaktadır. Leptin reseptörlerinin kinaz aktiviteleri yoktur. Bu nedenle, leptin ile tetkiklenen sinyal ileti yolaklarında Janus Kinaz 2 (JAK2) gibi kinazlara gereksinim duyulmaktadır (45,63). JAK/STAT yolağı, 4 non-reseptör tirozin kinaz (JAK'lar) ve spesifik tirozin ve serin rezidülerinin JAK'lar tarafından fosforilasyonu ile işlevleri düzenlenen 85-95 kDa molekül ağırlığına sahip transkripsiyon faktörlerden (STAT'lar) oluşmaktadır. Fonksiyonel sitokin reseptörleri JAK etkileşimi ve aktivasyonunda gerekli, prolince zengin Box1 domaini ve izoform seçiciliğinde önemli rol oynayan Box2 domainine sahiptir (63,64).

JAK ailesi, JAK1, JAK2, TYK2 (tirozin kinaz 2) ve JAK3'ten oluşmaktadır. JAK1, JAK 2 ve TYK2, hemen hemen tüm hücrelerde eksprese edilirken, JAK3 sadece hematopoetik immün hücrelerde eksprese edilmektedir (65,66). Leptinin leptin reseptörüne bağlanmasıyla aktive edilen JAK'lar hem kendi hemde uzun leptin reseptöründe yer alan diğer tirozin rezidülerini fosforiller. Böylece STAT proteinleri gibi diğer downstream sinyal proteinleri için bağlanma bölgeleri oluştururlar. Leptin tarafından uzun leptin reseptör izoformunun aktive edilmesi, STAT3 için bağlanma bölgesi ve STAT1, STAT5 ve STAT6'nın aktivasyonu sağlar. JAK tarafından fosforile edilen STAT proteinleri, spesifik DNA bağlanma bölgesine bağlanabileceği ve enerji homeostazından sorumlu genleri aktive ettiği nukleusa geçer (Şekil 2.7)(67).



Şekil 2.7. Ob-Rb aracılığı ile aktive edilmiş JAK/STAT yolu (6)

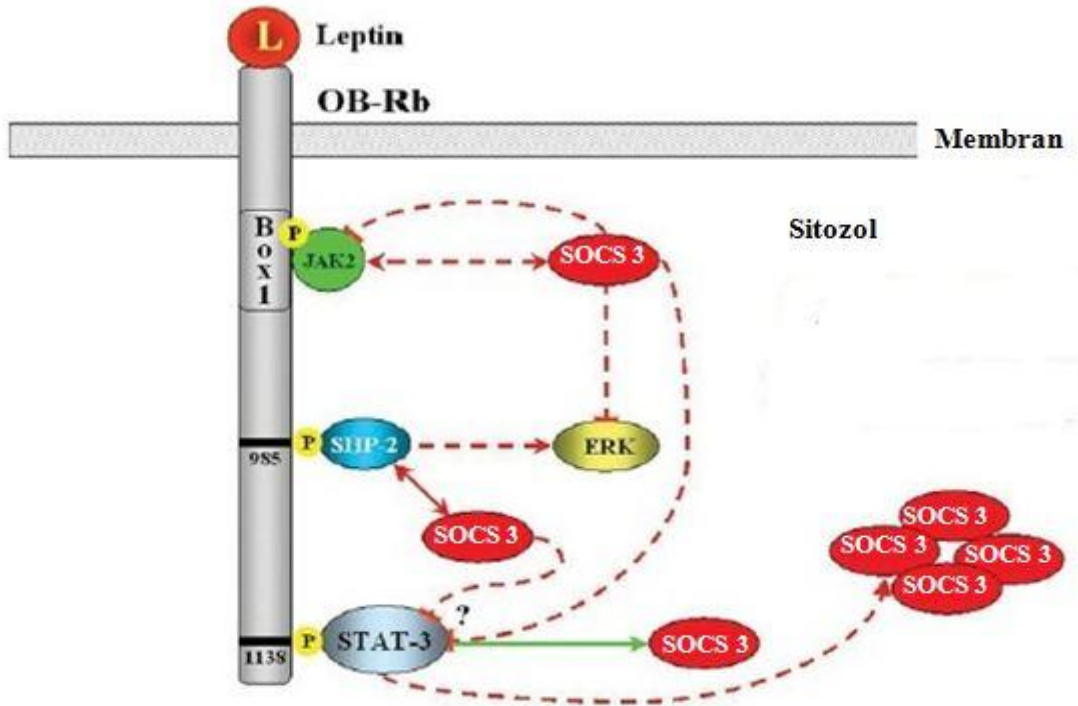
Uzun leptin reseptör izoformunun 3 intrasellüler aminoasit rezidüsü, sinyal iletiminde farklı görevler üstlenmektedir. Tyr⁹⁸⁵ Ras/Raf/ERK yolu için gereklidir. Tyr⁹⁸⁵'in fosforilasyonu, tirozin fosfatızın SH2 domaini için bağlanma bölgesi oluşturur ve böylece p21/ERK sinyal kaskadının aktivasyonu sağlanmış olur. Tyr¹⁰⁷⁷ ve

Tyr¹¹³⁸, STAT5, Tyr¹¹³⁸ ise, STAT1 ve STAT3'ün aktivasyonu için önemlidir. Tyr⁹⁸⁵, sitokin sinyal inhibitör proteinlerine (SOCS) bağlanarak uzun leptin reseptör izoformu sinyalinde önemli bir rol oynamaktadır. SOCS proteinleri JAK/STAT yolağının negatif düzenleyicileri olarak işlev görmektedirler (68,69).

Leptin JAK/STAT yolağı aracılığı ile hipotalamusta etkisini göstererek vücut ağırlığının kontrolünü düzenlemekle kalmayıp immün hücrelerde de etkisini göstermektedir. Monositlerde JAK2/STAT3 aktivasyonu, T-lenfositlerin aktivasyonu ve proliferasyonunu uyaran JAK ve STAT'ların fosforilasyonunu arttırmaktadır (68).

2.4.1.1. Sitokin Sinyal İnhibitör (SOCS) Proteinleri :

SOCS proteinleri, JAK/STAT yolağının negatif düzenleyicileridir. Bu proteinler, sitokin uyarımı ile aktive olmakta ve çeşitli sitokin reseptörleri aracılığı ile sinyali zayıflatmaktadır. SH2 domainine sahip SOCS proteinleri, fosforile olmuş tirozin kinazlara bağlanarak veya fosforile olmuş reseptörlerle direkt etkileşime girerek sinyalin baskılanmasına neden olmaktadır (Şekil 2.8)(70,71).



Şekil 2.8. Leptin direncinde SOCS proteinlerinin rolü (6)

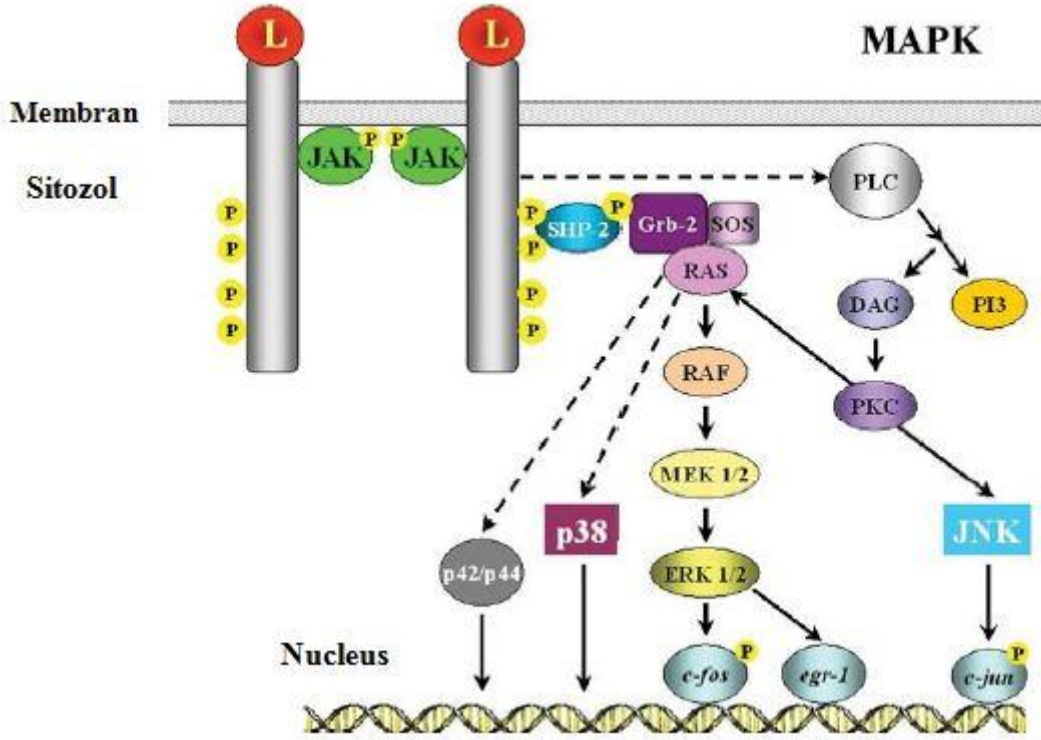
SOCS protein ailesinin 8 üyesi bulunmaktadır. Bunlar: Src-homoloji 2 proteini, SOCS1-7 proteinleridir. SOCS proteinleri, merkezi bir SH2 domaini, N-terminal öncü SH2 domaini ve bazılarında kinaz aktivitesini engelleyen kinaz inhibitör bölgesi(KIR) ve korunmuş bir C-terminal box bölgeleri ile karakterize edilirler. Sadece SOCS1 ve SOCS 3, N-terminal bölgelerinde kinaz inhibe edici bölge(KIR) içerirler. Her ikisi de farklı mekanizmalarla uzun reseptör izoform sinyalini inhibe ederler (72,73).

2.4.1.2.Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz (MAPK) Yolağı :

MAP kinazlar, diferansiyasyon, proliferasyon ve apoptoz gibi hücresel işlevleri kontrol eden bir grup kinaz olarak bilinmektedir. MAP kinaz ailesinin üyeleri, iyi tanımlanmış Ras/Raf/MAPK sinyal kaskadı bileşenlerini içermektedir ve bu yolak leptini de kapsayan çok sayıda uyarıcı tarafından aktive edilebilmektedir (63). Kısa veya uzun leptin reseptör izoformu, MAP kinaz yolağını uyarabilir fakat kısa leptin reseptör izoformu daha az etkilidir. Leptin reseptörlerinin distal kısmı MAP kinaz sinyali için gerekli olmasa da, uzun reseptör formunun intraselüler kısmı aktivasyon için gereklidir. Leptin MAP kinaz yolağını 2 yolla aktive edebilir:

1. JAK2 tirozin fosforilasyonu aracılığı ile
2. Reseptör fosforilasyonundan bağımsız olarak

Her iki yolda da fosfatazlar için bağlanma bölgesi olarak SH2 domainine ihtiyaç vardır. Leptin aracılı MAP kinaz yolağında aktive olmuş MEK'ler (MAPK/ERK kinazlar) ekstraselüler reseptör kinazları (ERK1-2) fosforile etmekte ve böylece hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunda yer alan c-fos, egr-1 gibi çeşitli spesifik genlerin ekspresyonunu düzenlemektedirler (54).



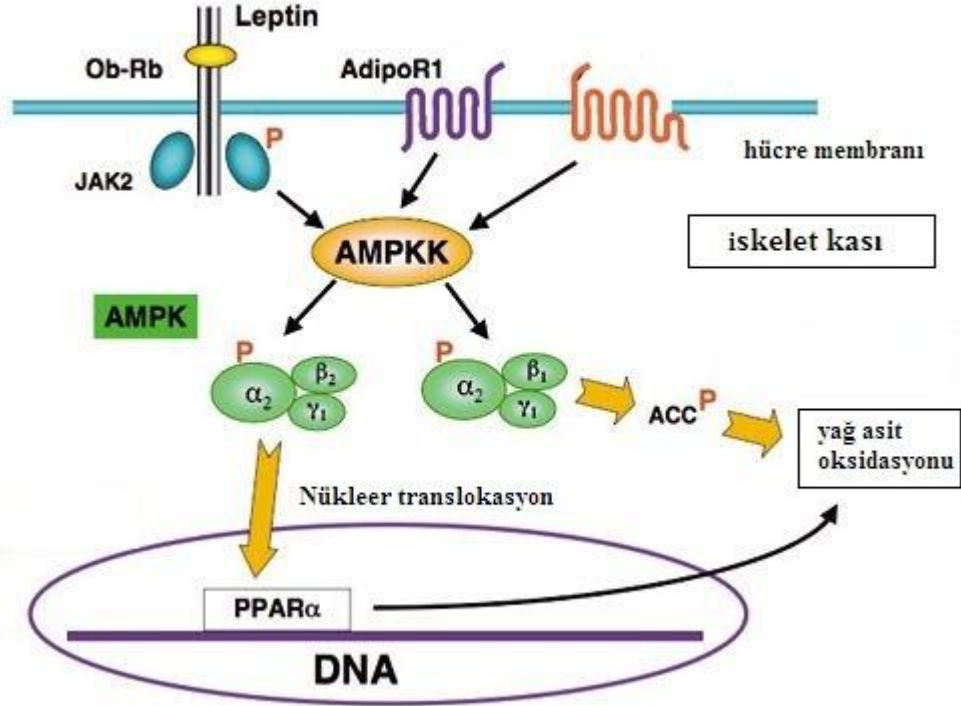
Şekil 2.9. MAP kinaz aracılı sinyal yolağı (6)

ERK1/2 leptinin merkezi görevlerini yerine getirmesine yardım eden kinazlardır ve besin alınımı, vücut ağırlığı ve enerji homeostazında kilit rol oynarlar. Leptinin ayrıca MAP kinaz yolağı aracılığı ile osteoblastik öncü hücrelerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bu yolda, MAP kinaz aracılığı ile ERK1/2'nin fosfolipaz 2'yi aktive etmesi, sitokrom C salınımına ve kontrollü hücre ölümüne neden olan kaspaz 3 ve 9'un aktivasyonuna ve apoptozun indüklenmesine neden olmaktadır (Şekil 2.9)(74).

2.4.1.3. AMP Bağımlı Protein Kinaz (AMPK) Yolağı :

Leptin, iskelet kasında Asetil-CoA karboksilazın (ACC) etkisini bloklayarak yağ asit oksidasyonunu stimüle eder (Şekil 2.10). AMPK ise, hipotalamusta hormonal ve besinsel sinyallere yanıt olarak besin alınımını düzenlemektedir. AMPK aktivasyonu anabolik yolları durduran bir sinyal görevi görür ve ATP/AMP oranındaki azalmaya yanıt olarak katabolik süreçleri harekete geçirir. AMPK aktivasyonu ile paralel olarak leptin, ACC aktivitesini başlatır ve böylece kas hücrelerinde β oksidasyonunu stimüle eder. Leptinin kas hücrelerinde AMP seviyesini nasıl arttırdığı ve AMPK'yı nasıl aktive ettiği tam olarak netlik kazanmamıştır (54,75)

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, leptinin hipotalamustaki antiobezite etkisini AMPK aktivitesini baskılayarak gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır. Glukoz, insülin gibi diğer anoreksijenik ajanlar, AMPK'yı inaktive etmekte ve besin alınımını azaltmaktadır. Aksine, grelin gibi oreksijenik faktörler, AMPK'yı aktive etmekte ve besin alınımını arttırmaktadır (76).



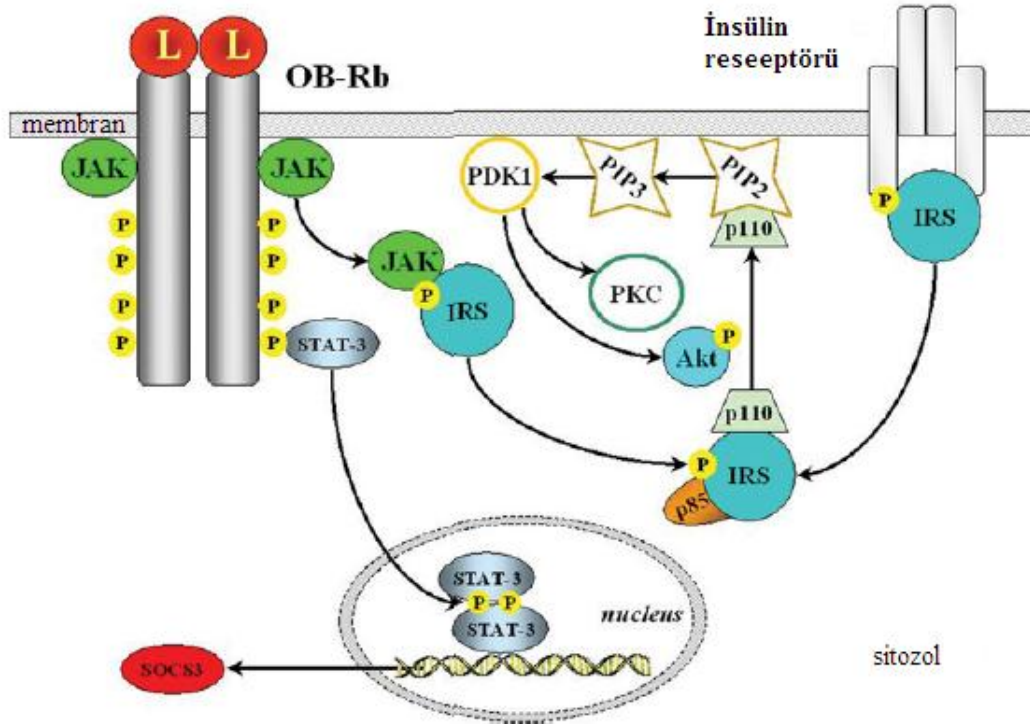
Şekil 2.10. leptin sinyalinde AMPK yolağı (77)

2.4.1.4. Fosfatidilinozitol 3 Kinaz (PI3K) Yolağı:

Fosfatidilinozitol 3-kinazlar, katalitik ve düzenleyici alt ünitelerden meydana gelmişlerdir ve büyüme, metabolizma ve kemotaksis gibi çeşitli hücrel fonksiyonları kontrol ederler. PI3K kompleksi, fosfatidilinozitol olarak bilinen lipid substratlarındaki inozitolün 3' hidroksil grubunu fosforlar (78).

PI3K sinyal yolağı, çok sayıda büyüme faktörü ve hormonlar tarafından indüklenir. Örneğin, insülin reseptörünün aktivasyonu, insülin reseptör substrat 1 ve 2 (IRS1 ve IRS2) deki tirozin rezidülerinin fosforilasyonuna neden olur. Bu fosforilasyon diğer sinyal moleküllerinin bağlanma affinitesini artırır ve böylece sinyalin sonraki

basamakları aktive edilir (Şekil 2.11). Fosfatidilinozitollerin PI3K tarafından fosforilasyonu, leptinin çoğu hücre içi etkilerini düzenleyen fosfoinozitid bağımlı kinaz 1 (PDK-1) ve protein kinaz B olarak bilinen Akt gibi çeşitli downstream hedefleri aktive eder. Son yıllarda yapılan çalışmalar, hipotalamik nöronlar vasıtasıyla PI3K yolağının enerji ve besin alınımının düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir (54). İnsülin ve leptin, glukoz homeostazı besin alınımı, enerji tüketimi ve sempatik aktiviteyi kontrol eden hipotalamik nöronlarda görev alan önemli hormonlardır. Leptin tarafından PI3K sinyal yolağının aktivasyonu, hipotalamusta enerji homeostazını ve nöroendokrin fonksiyonları düzenleyerek leptinin insülin direnci üzerindeki etkisine aracılık eder. İn vivo ve in vitro çalışmalar, myosit, hepatosit ve hipotalamik dokuları da kapsayan çeşitli doku ve mürin hücrelerinde leptinin, PI3K yolağını aktive ettiği göstermiştir. Benzer şekilde kanser hücrelerinde, adipoz, karaciğer ve kas dokularında da bu yolağı tetikleyebilmektedir. PI3K aktivasyonu, sinyal basamağının alt kısımlarında IRS aracılığı ile gerçekleşmektedir (16,79).



Şekil 2.11. İnsülin indüklü yollarda leptin sinyali (6)

2.5. Gastrointestinal Boşlukta Leptin:

Gastrointestinal boşlukta leptin büyük oranda midede üretilmektedir. Gastrik mukozadaki endokrin ve ekzokrin hücreler leptin üretmektedir. Leptin reseptörleri de gastrointestinal sistemde, özellikle barsağın proksimalinde bol miktarda üretilmektedir. Leptinin gastrointestinal boşluktaki hareketlilik üzerine kompleks etkileri vardır. Afferent ve efferent sinir uçları leptin reseptör içermektedir. Leptin, ince barsakta mekanoreseptörler üzerine uyarıcı ve inhibitör etkilere neden olabilir. Leptin eksikliğinin farelerde gastrik boşalmayı arttırdığı, jejunumdaki transit aktivitesini arttırdığı ve ince barsakta total transit zamanı kısalttığı gösterilmiştir (80,81). Bazı çalışmalar, leptinin gastrointestinal boşlukta trofik bir faktör olduğunu ve dışarıdan verildiğinde sindirim sisteminde yer alan epitelyum hücrelerinin proliferasyonu ve besin absorpsiyonunu uyarabildiğini göstermiştir (82,83).

İBS'li hastalar, değişken gastrointestinal yakınmalara maruz kaldıklarından yaşam konforları bozulmuş hastalardır. Hastalığın tanısında ise herhangi bir biyokimyasal, yapısal yada moleküler parametre henüz belirlenmiş değildir. Leptin ve leptin reseptörleri sahip oldukları işlevler dikkate alındığında, bu molekülleri kodlayan genlerdeki genetik değişimlerin İBS etiopatogenizinde rol alabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle leptin ve leptin kodlayan genler, İBS için birer aday gen özelliği taşımaktadır.

Bu çalışmada, İBS gelişimi için leptin ve leptin reseptörlerindeki fonksiyon kaybına yol açabilecek gen polimorfizmlerinin İBS'li hastalarda araştırılması amaçlanmaktadır. Elde edilecek veriler bu konudaki bilgi eksikliğini doldurabileceği gibi hastalık etiopatolojisi hakkında da yeni bilgiler edinmemize katkı sağlayacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İrritabl Barsak Sendrom'lu bireylerde leptin ve leptin reseptör gen polimorfizmlerinin araştırıldığı bu çalışmada, hasta ve kontrol gruplarının oluşturulması, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı tarafından gerçekleştirildi. Hasta ve kontrol grubuna ait bireylerden alınan kan örneklerinin moleküler analizi ise, birimize bağlı moleküler genetik laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmamızda hasta grubu oluşturulmadan önce Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı.

Çalışmada, hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerden DNA izolasyonu için 7-8 ml venöz kan 1 ml % 2'lik etilendimetiltetraasetik asit (EDTA) içeren, 15 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. DNA izolasyonuna kadar -20°C 'de saklandı. DNA eldesi Miller'in tuz çöktürme yöntemine göre yapıldı. Elde edilen DNA'lardan leptin G/A rs17151919 ve leptin reseptör G/A rs3790434 polimorfizmlerine ait gen bölgelerinin çoğaltılması ve moleküler analizi için Real-Time PCR yöntemi kullanıldı. Saptanan polimorfizm verileri istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) cihazı
- Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- Santrifüj (Nüve NF-800)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- Vorteks (VELP)
- Mikropipet Seti (Eppendorf)

- Termal Cykler (Techne Progenen, Cambridge, UK)
- Mikrodalga Fırın (Samsung)
- Elektroforez Tankı (Midicell EC-350)
- Elektroforez Güç Kaynağı (EC-135-90)
- Jel Görüntüleme (Vilber Lourmat Marne La Vallee, France)
- Elektromanyetik Karıştırıcı (Nüve MK-418)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- EDTA (Sigma E-5134)
- Tris-Hidroklorid (Sigma T-7149)
- 2X TaqMan Universal PCR Master Miks (Applied Biosystems)
- Agaroz (LE Prone Basica 051342 PR)
- Orange G (Sigma O-3756)
- Tris Base (Sigma T-6066)
- Ethidyum Bromide (Sigma E-1510)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- TaiI (Fermentas,#ER1141)
- Gene Ruler 50bp DNA Ladder (MBI Fermentas SM0371)
- 2 mM dNTPmix (MBI Fermentas R0242)
- 10X PCR Buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (MBI Fermentas #B33)
- SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Taq DNA Polimeraz (Fermentas EP 0402)
- Proteinaz K (MBI Fermentas E00491)

- Bidistile Su (Sigma W-3500)
- NaCl (MERK 1.06404.1000)
- Tris EDTA Buffer
- Amonyum Asetat (Amresco MW 77.08)
- Primerler: G/A rs17151919 polimorfizmi için;
 F: 5'-ACTGGCAGTCTACCAACAGATCCT-3'
 R: 5'-AGGTTCTCCAGGTCGTTGGA-3'

G/A rs3790434 polimorfizmi için;
 F: 5'-TTGACCGGAACGGAGGTG-3'
 R: 5'-AGACATGGCGGGCGTTAA-3'

- Problar: G/A rs17151919 polimorfizmi için;

Prob A: 5'-Yakima Yellow-TT(pdC)(pdC)AGAAA(pdC)ATGAT(pdC)AAA-BHQ-1-3'

Prob G: 3'-FAM-T(pdC)(pdC)AGAAA(pdC)GTGAT(pdC)(pdC)AA-BHQ-1-3'

G/A rs3790434 polimorfizmi için;

Prob A: 5'-Yakima Yellow-CA(pdC)A(pdC)GACAAG(pdC)GAG(pdC)C-BHQ-1-3'

Prob G: 3'-FAM-A(pdC)A(pdC)GACGAG(pdC)GAG(pdC)C-BHQ-1-3'

3.1.3. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler

Nüklei Lizis Buffer

Tris-HCl1.576 g

NaCl23.4 g

Na₂EDTA.....0.7 g

1 litre distile suya tamamlanıp çözüldükten sonra otoklavda steril edildi ve +4 °C de saklandı.

%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi

10 g SDS, 100 ml distile suda çözüldü.

10 M Amonyum Asetat Buffer

148 g amonyum asetat,

200 ml distile suda çözülür.

TE Buffer

Tris-HCl0.394 g

Na₂EDTA.....0.093 g

250 ml distile suya tamamlanıp çözüldükten sonra otoklavda steril edildi ve +4°C'de saklandı.

Proteinaz K

Liyofilize 100 mg Proteinaz K, 10 ml steril distile su ile çözümlenerek 10 mg/ml'lik konsantrasyona getirildi ve -20 °C'de saklandı.

3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmaya, hasta grubu olarak İrritabl Barsak Sendromu tanısı konmuş 159 hasta birey ve kontrol grubu olarak 104 sağlıklı birey olmak üzere toplam 263 bireyden alınan kan örnekleri dahil edildi.

Hem hasta hem de kontrol grubunu oluşturan bireylere ait bilgiler, etik kurallara uygun olarak hazırlanan anket formları kullanılarak alındı. Çalışmaya dahil olmayı kabul eden her bireyin bilgilendirilmiş onayı alındıktan sonra, 7-8 ml periferik kan alınarak 1 ml, % 2'lik EDTA içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu.

3.3. Leptin (LEP) Geni Val94Met (G>A, rs17151919) ve Leptin Reseptör (LEPR) Geni (G>A, rs3790434) Polimorfizmlerinin Real Time PCR Yöntemiyle Moleküler Genetik Analizi

3.3.1. DNA'nın İzolasyonu

Hasta ve kontrol grubuna ait Miller'in tuz çöktürme yöntemi ile DNA izolasyonu (Miller 1998) için 7-8 ml venöz kan alınıp içinde 1 ml EDTA bulunan 15 ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine konularak +4⁰C'de saklandı. İzolasyon sırasında kros-kontaminasyonu önlemek için her bir örnek için ayrı pipet kullanıldı. DNA izolasyonu için aşağıda verilen yöntem uygulandı:

1. Periferik kan örnekleri, steril soğuk distile su ile 13 ml'ye tamamlandı.
2. Kapakları kapatıldıktan sonra elle yaklaşık 2-3 dk hızlı olarak aşağı yukarı karıştırılarak homojenize edildi.
3. 10 dk 2000 rpm'de ilk santrifüjleme gerçekleştirildikten sonra santrifüjlenen tüplerin süpernant kısımları transfer pipeti yardımıyla alınarak atıldı. Tüplere tekrar soğuk distile su ilave edilerek 14 ml'ye tamamlandı ve çalkalama işlemi gerçekleştirildi.
4. 10 dk 2000 rpm'de santrifüjlendi
5. Supernatant kısım berrak bir görüntü alana kadar tüplerdeki çalkalama ve santrifüjleme işlemleri yaklaşık 4-5 kere tekrarlandı.
6. Son santrifüjleme ve supernatantın atılması işleminden sonra pelet üzerine lökositlerin nükleuslarının parçalanmasını ve serbest hale gelmesini sağlayan 3 ml nüklei lizis buffer tüplere eklendi ve 15-20 kere elle çalkalandı.
7. 200 µl % 10 SDS ve 150 µl proteinaz-K eklenerek homojenizasyon sağlandı.
8. 37⁰C'de 12 saat inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonrası tüplere 2 ml, 6 M NaCl eklenerek karıştırıldı ve 10 dk oda ısısında bekletildi.
10. 15 dk 3500 rpm'de santrifüjlendi.

11. Süpernantlar transfer pipetiyle boş bir tüpe alındı ve üzerine tamamlayacak şekilde soğuk saf etanol (% 99,8) eklenerek DNA'nın yoğunlaşması sağlandı.

12. Yoğunlaşan ve görünür hale gelen DNA mikropipet ucuyla çekmeden, uca dikkatlice sarılarak daha önce 500 µl TE buffer konulan ependorf tüplere alındı ve 37 °C'de bir gece bekletilerek DNA'ların TE buffer içerisinde çözünüp homojen hale gelmesi sağlandı. Tüm DNA örnekleri, PCR öncesi +4 °C'de saklandı.

3.3.2. Real Time PCR İle Genotiplerin Belirlenmesi:

Real-Time PCR genotipleme deneyi Applied Biosystems (ABI) Prism 7500 Real Time PCR cihazı üzerinde gerçekleştirildi. Şekil 3.1 ve 3.2'de belirtildiği gibi primer eşleşme bölgeleri mavi ile işaretlenmiştir. Pembe renk ile işaretlenen nükleotid ise polimorfik alleli işaret etmektedir. Prob eşleşme bölgeleri ise yeşil ile işaretlenmiştir. Leptin genine ait çoğaltılan bölge 77 bp (Şekil 3.1), leptin reseptör geni için ise 81 bp'den oluşmaktadır (Şekil 3.2).

Çizelge 3.1. LEP ve LEPR genlerinin primer dizileri ve PCR sonrasında elde edilen bant uzunlukları (bp).

| Gen | Primer Dizisi | Ürün(bp) | |
|------|---------------|---------------------------------|-------|
| LEP | Forward | 5'-ACTGGCAGTCTACCAACAGATCCT- 3' | 77 bp |
| | Reverse | 5'-AGGTTCTCCAGGTCGTTGGA-3' | |
| LEPR | Forward | 5'-TTGACCGGAACGGAGGTG-3' | 81 bp |
| | Reverse | 5'-AGACATGGCGGGCGTTAA-3' | |

Çizelge 3.2. LEP ve LEPR genlerinin prob dizileri

| Gen | Prob Dizisi |
|-------------|--|
| LEP | PrA 5'-Yakima-TT(pdC)(pdC)AGAAA(pdC) <u>A</u> TGAT(pdC)AAA-BHQ-1-3' PrG 3'-FAM-T(pdC)(pdC)AGAAA(pdC) <u>G</u> TGAT(pdC)(pdC)AA-BHQ-1-3' |
| LEPR | PrA 5'-Yakima-CA(pdC)A(pdC)GACA <u>A</u> G(pdC)GAG(pdC)C-BHQ-1-3' PrG 3'-FAM-A(pdC)A(pdC)GACG <u>A</u> G(pdC)GAG(pdC)C-BHQ-1-3' |

ACTGGCAGTCTACCAACAGATCCTCACCAGTATGCCTTCCAGAAACGTGAT
CCAAAATATCCAACGACCTGGAGAACCT

Şekil 3.1.Leptin genine ait çoğaltılan bölge (77bp)

TTGACCGGAACGGAGGTGGCAACCCCACCACACGACAAGCGAGCCGGGGA
CCGCGATGTACCTTTAACGCCCGCCCATGTCT

Şekil 3.2. Leptin reseptör genine ait çoğaltılan bölge (81bp)

Her prob, 5' ucunda FAM (6-karboksifloresin) ile işaretlenmiş ışığa yapabilen bir boya ve 3' ucunda ise BHQ adındaki "quencher" yani söğürücü bir boya ile işaretlenmiştir. 3' ucundaki baskılayıcı "quencher", 5' ucundaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Ayrıca, sitozin nükleotid yerine sitozin analogu olan C-5 propinil-deoksiribo Sitozin (pdC) ilavesiyle prob dizayn edilmesi sırasında floresan boya ile işaretli oligonükleotidin erime sıcaklığı (Tm) artırılarak hedefe özgüllük korunmaya çalışıldı (Çizelge 3.2). Prob dizilerinde altı çizili nükleotid polimorfik alleli belirtmektedir. LEP ve LEPR genlerine özgü kullanılan prob, Yakima Yellow işaretlidir. Değerlendirme sürecinde "VIC" olarak değerlendirilmesinin sebebi "Yakima Yellow" ile "VIC"ın benzer dalga boylarında ışığa yapmasıdır (84).

3.3.2.1. Real-Time PCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanışı:

Real-Time PCR reaksiyon karışımı, son hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı:

- a) 12.5 µl, 2X TaqMan Universal PCR Master Miks (Applied Biosystems)
- b) 2.5 µl, 900 nmol primer (LEP-F)
- c) 2.5 µl, 900 nmol primer (LEP-R)
- d) 0.4 µl, 200nmol Yakıma işaretli prob (LEP-PrA)
- e) 0.4 µl, 200nmol FAM işaretli prob (LEP-PrG)
- f) 4.2 µl Distile Su
- g) 2.5 µl kalıp DNA (30 ng)

3.3.2.2. Real-Time PCR reaksiyon Şartları:

| | | |
|---------|-------------------------|----------|
| 50°C'de | 2 dakika ön inkübasyon | 1 döngü |
| 95°C'de | 10 dakika aktivasyon | 1 döngü |
| 95°C'de | 15 saniye denatürasyon | 40 döngü |
| 60°C'de | 1 dakika bağlanma/uzama | 40 döngü |

Real-Time PCR işlemi ve genotiplerin belirlenmesi “ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)” cihazı ve “SDS 2.0.3 software for allelic discrimination (Applied Biosystems)” programı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

İrritabl Barsak Sendromu ile leptin (LEP) ve leptin reseptör (LEPR) gen polimorfizmleri arasındaki istatistiksel ilişkinin belirlenmesi amacıyla yürütülen bu çalışmaya ait verilerin istatistiksel analizi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim Anabilim Dalı'ndan danışmanlık alınarak yapıldı.

Yaş bakımından hasta ve kontrol grupları arasında farklılık olup olmadığı Independent Samples t test ile incelendi. Hastalık ile genotiplerin ve allellerin ilişkileri ki-kare testi ile incelendi. Genotip bakımından grupların Hardy-Weinberg dengesi kontrol

edildi. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma cinsinden, kategorik değişkenler için ise frekans ve yüzde olarak verildi. Tüm istatistiksel analizler için SPSS v.11.5 paket programı kullanıldı ve analizlerde $p < 0,05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edildi.

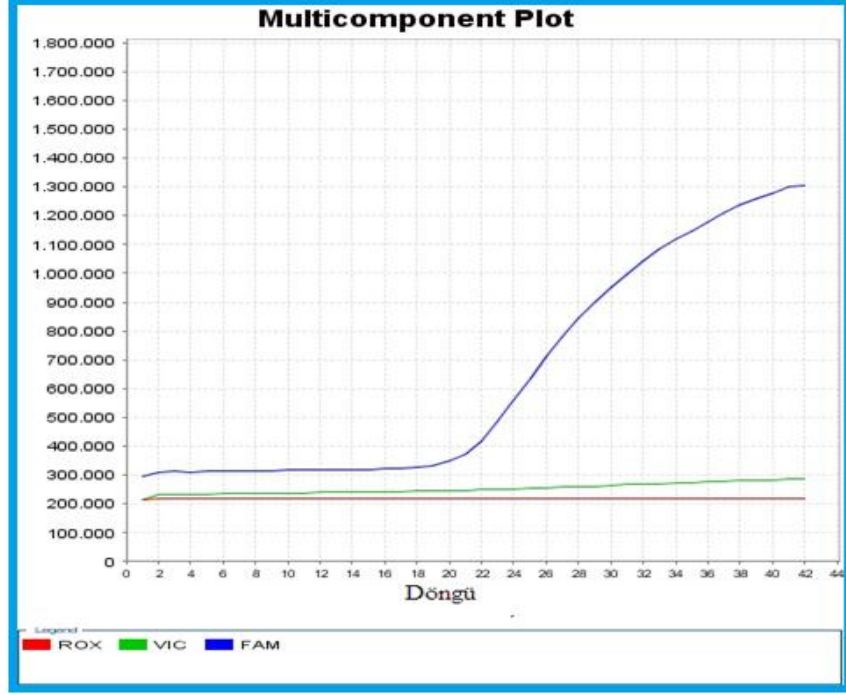
4.BULGULAR

İrritabl Barsak Sendromu'nda leptin ve leptin reseptör gen polimorfizmlerinin araştırıldığı bu çalışmada, hasta grubu; Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'nda İrritabl Barsak Sendromu tanısı konmuş, 19-89 yaş aralığındaki 159 gönüllü bireyden oluşturuldu. Kontrol grubu ise, geçmişte İrritabl Barsak Sendromu tanısı konmamış, yaşları 33-81 arasında değişen 104 bireyden oluşturuldu.

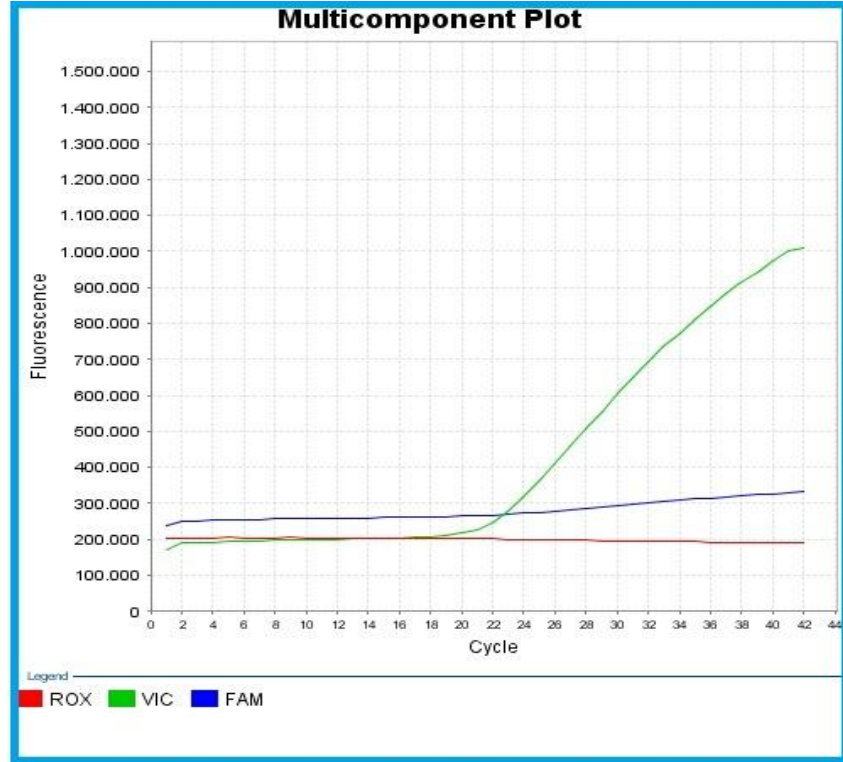
Leptin ve leptin reseptör genlerinin polimorfizmleri araştırılırken, 104 kontrol grubu ve 159 İrritabl Barsak Sendrom'lu birey olmak üzere toplam 263 kişiden oluşan örnek hacmi kullanıldı.263 kişiden oluşan araştırma popülasyonundaki her bir birey için genotiplendirme işlemi “ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)” cihazı ve “SDS 2.0.3 software for allelic discrimination (Applied Biosystems)” programı kullanılarak gerçekleştirildi.

4.1. Real-Time PCR İle İlgili Bulgular:

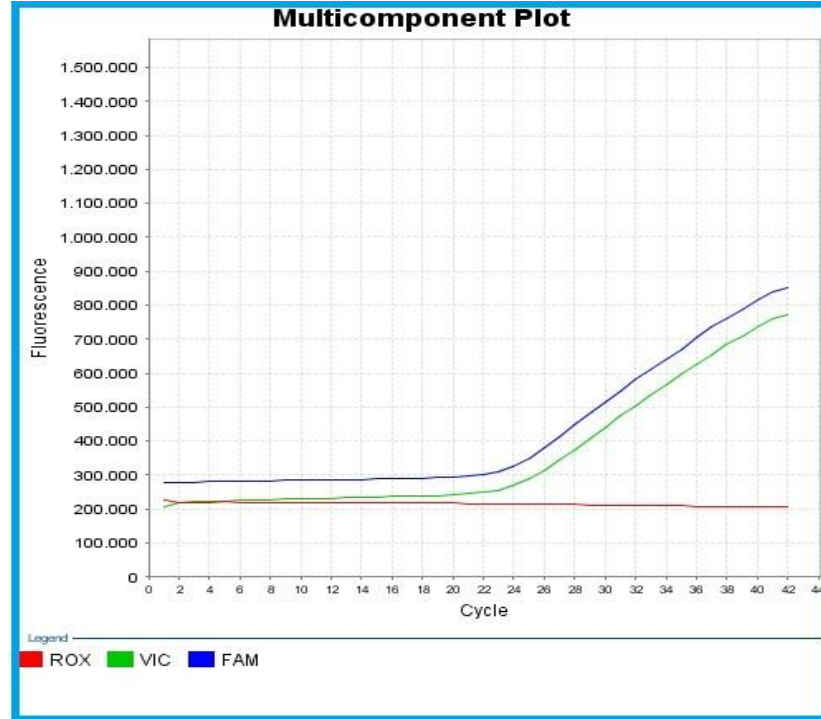
Hedef DNA bölgesine hibridize olan primer probun bir ucunda floresan ışığa yapan bir boya ve diğer ucunda quencer yer almaktadır. Probların her bir reaksiyon döngüsündeki floresan ışınması ölçülerek farklı allelleri taşıyan oligonükleotidlerin amplifikasyon miktarları belirlendi. Real-Time PCR reaksiyon miksi, 96 kuyucuklu saydam polipropilen tabağın (plate) kuyucuklarına yerleştirildi. Real-Time PCR cihazında, PCR amplifikasyon eğrilerinden yararlanılarak her bir gen için ilgili bölgenin genotiplendirilmesi yapıldı.



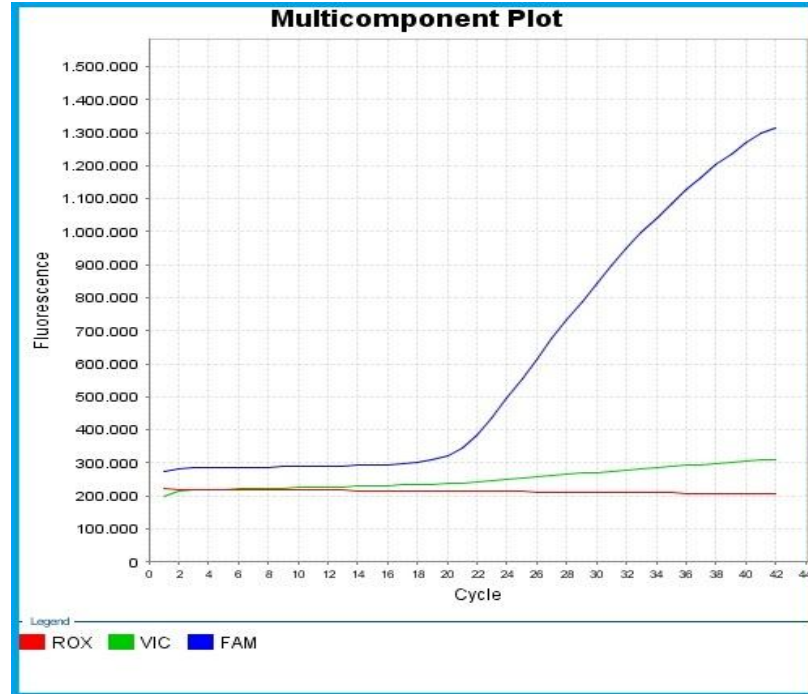
Şekil 4.1. Real-Time PCR analizi ile, Yakima Yellow ile işaretlenen ‘A’, FAM ile işaretlenen ‘G’ nükleotidlerin, LEP genine ait rs17151919 bölgesindeki GG homozigot genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya)



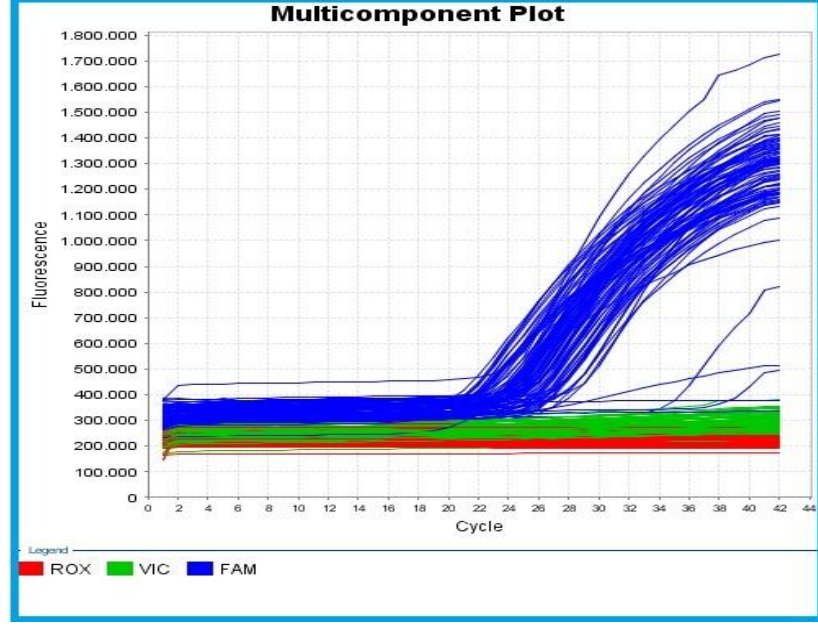
Şekil 4.2. Real-Time PCR analizi ile, Yakima Yellow ile işaretlenen ‘A’, FAM ile işaretlenen ‘G’ nükleotidlerin, LEPR genine ait rs3790434 bölgesindeki AA homozigot genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya)(2 no’lu hasta)



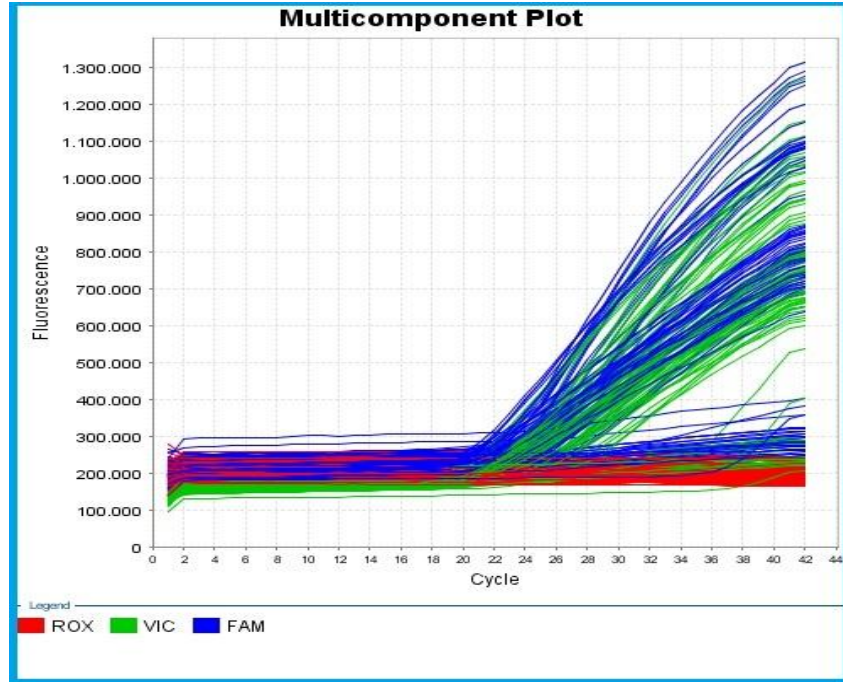
Şekil 4.3. Real-Time PCR analizi ile, Yakima Yellow ile işaretlenen ‘A’, FAM ile işaretlenen ‘G’ nükleotidlerin, LEPR genine ait rs3790434 bölgesindeki GA heterozigot genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya)(11 no’lu hasta)



Şekil 4.4. Real-Time PCR analizi ile, Yakima Yellow ile işaretlenen ‘A’, FAM ile işaretlenen ‘G’ nükleotidlerin, LEPR genine ait rs3790434 bölgesindeki GG homozigot genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya)(12 no’lu hasta)



Şekil 4.5. Real-Time PCR analizi ile, Yakima Yellow ile işaretlenen "A", FAM ile işaretlenen "G" nükleotidlerin, LEP genine ait rs17151919 bölgesindeki genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya)(hasta ve kontrol grubunda)

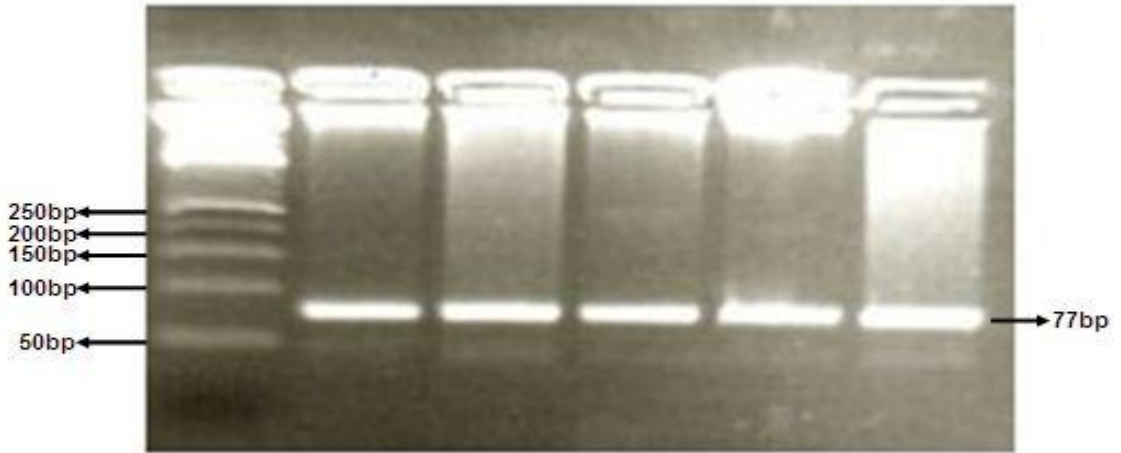


Şekil 4.6. Real-Time PCR analizi ile, Yakima Yellow ile işaretlenen "A", FAM ile işaretlenen "G" nükleotidlerin, LEPR genine ait rs3790434 bölgesindeki genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya)(hasta ve kontrol grubunda)

4.1.1. Leptin geni (val94met) Polimorfizmine Ait Genotiplerin İBS İle İlişkisi:

Leptin (val94met) polimorfizmine ait bulgular incelendi. Hasta ve kontrol grubuna ait genotipler Real-Time PCR yöntemiyle analiz edildi. Kontrol grubundaki bireylerle İrritabl Barsak Sendrom'lu bireylere ait genotip ve allel sıklıkları incelendiğinde; GG genotipinin ve G allelinin görülme sıklığı hem kontrol grubunda (159 bireyde) hem de hasta grubunda (104 bireyde) %100 olarak saptandı. GA ve AA genotipine her iki grupta da rastlanmadı (Şekil 4.1)(Şekil 4.5).

Her iki grupta da yalnızca GG genotipinin gözlenmesi üzerine örnekler PCR ve RFLP yöntemi kullanılarak tekrar gözden geçirildi. Her bir örnek elektroforez yöntemiyle agaroz jel üzerinde yürütüldükten sonra 240 nm dalga boyundaki UV görüntüleme cihazı kullanılarak genotipler elde edildi. TaiI kesim enzimi ile yapılan RFLP analizi sonucunda 77 bp'lik PCR amplifikasyon ürününün hiç kesilmediği (yabanıl tip) olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.7. Leptin(val94met) polimorfizminin hasta grubuna ait genotiplerin elektroforez sonrası fotoğrafı. 71,72,73,74,75 numaralı örnekler GG genotipine sahip bireyler.

4.1.2. Leptin Geni İle İBS Arasındaki İstatistiksel İlişki:

Çalışmamızda, hasta grubunu oluşturan 159 İBS'li bireyin 117'si kadın (%73,1) ve 43'ü erkek (26,9) olup yaş ortalamaları $\pm 44,3063$ idi. Kontrol grubunu oluşturan 105 sağlıklı bireyin ise, 46'sı kadın (%43,8) ve 59'u erkek (%56,2) olup yaş ortalaması $\pm 50,1905$ idi (Çizelge 4.1).

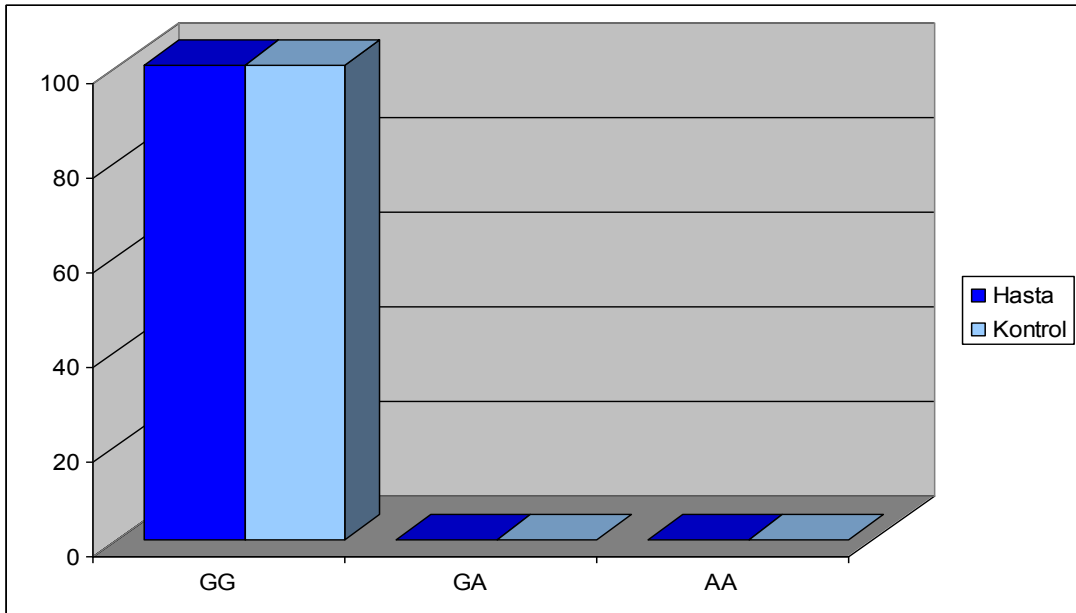
Çizelge 4.1. Kontrol ve hasta gruplarının yaş ortalamaları

| Grup | N | Ortalama | Standart Sapma | p değeri |
|---------|-----|----------|----------------|----------|
| Hasta | 159 | 44,3063 | 11,26183 | p< 0,001 |
| Kontrol | 104 | 50,1905 | 12,94303 | |

Kontrol grubunun yaş ortalaması, hasta grubunun yaş ortalamasından istatistiksel anlamda yüksek bulunmuştur (p<0,001). Yapılan istatistik inceleme sonucunda LEP geni (rs17151919) ile hastalık arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.8) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. LEP geni için hasta ve kontrol gruplarının genotip frekansı

| LEP(val94met) Genotipleri | GRUP | | | |
|------------------------------|---------|-------|-------|-------|
| | Kontrol | | Hasta | |
| | n | n (%) | n | n (%) |
| GG | 104 | 100 | 159 | 100 |
| GA | — | — | — | — |
| AA | — | — | — | — |



Şekil 4.8. LEP geni için hasta ve kontrol gruplarının genotip frekanslarının grafiksel gösterimi

4.1.3. Leptin Reseptör Gen (rs3790434) Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol ve İBS'li Hasta Gruplarındaki Dağılımı

Kontrol grubundaki bireylerle İBS hastalarına ait genotip sıklıkları incelendiğinde; GG genotipinin görülme sıklığı kontrol grubunda %21.2 (22 kişide) iken, hasta grubunda %23.3 (37 kişide), GA genotipinin görülme sıklığı kontrol grubunda %47.1 (49 kişide) iken, hasta grubunda %45.9 (73 kişide), AA genotipinin görülme sıklığı kontrol grubunda %31.7 (33 kişide) iken, hasta grubunda %30.8 (49 kişide) olarak saptandı (Çizelge 4.3) (Şekil 4.6).

Sonuçlar allel frekansı açısından incelendiğinde; G allelinin görülme sıklığı kontrol grubunda % 44.7 (93 kişide) iken, hasta grubunda bu allelin görülme sıklığı % 46.2 (147 kişide), A allelinin görülme sıklığı kontrol grubunda % 55.3 (115 kişide) iken hasta grubunda %53.8 (171 kişide) olarak belirlendi (Çizelge 4.4).

4.1.4. Leptin Reseptör Geni İle İBS Arasındaki İstatistiksel İlişki:

Yapılan istatistiksel incelemede; kontrol ve hasta gruplarının *LEPR* (G>A, rs3790434) polimorfizmi açısından Hardy Weinberg dengesinde olduğu saptandı. Hasta grubu için $p=0,335$ ve kontrol grubu için $p=0,63$ olarak hesaplandı.

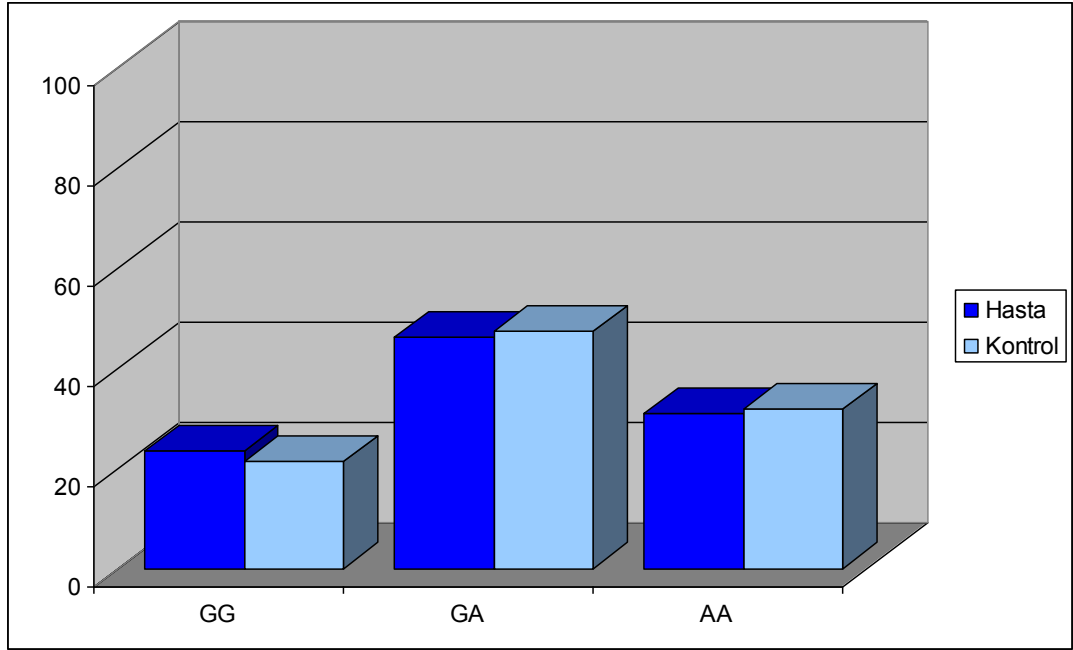
LEPR (G>A, rs3790434) genine ait genotip oranları ile İrritabl Barsak Sendromu arasında genotip dağılımları benzer bulunmuştur (Şekil 4.9).

Çizelge 4.3. *LEPR* geni için hasta ve kontrol gruplarının genotip frekansları

| LEPR (rs3790434) Genotipleri | GRUP | | | |
|---|----------------|--------------|--------------|--------------|
| | Kontrol | | Hasta | |
| | n | n (%) | N | n (%) |
| GG | 22 | 21.2 | 37 | 23,3 |
| GA | 49 | 47,1 | 73 | 45,9 |
| AA | 33 | 31.7 | 49 | 30,8 |

Çizelge 4.4. LEPR (rs3790434) polimorfizmi allel frekansları

| LEPR (rs3790434) Allelleri | GRUP | | | |
|-------------------------------|---------|-------|-------|-------|
| | Kontrol | | Hasta | |
| | N | n (%) | N | n (%) |
| G Allel Frekansı | 93 | 44.7 | 147 | 46.2 |
| A Allel Frekansı | 115 | 55.3 | 171 | 53.8 |



Şekil 4.9. LEPR geni için hasta ve kontrol gruplarının genotip frekanslarının grafiksel gösterimi

5. TARTIŞMA

İBS, abdominal ağrı, şişkinlik ve barsak hareketlerindeki değişikliklerle karakterize sürekli veya tekrar eden gastrointestinal bir hastalıktır. Araştırmalar toplumun yaklaşık % 3-20'sinde İBS semptomları olduğunu göstermiştir (85). Hastalık bireylerin sosyal hayatını olumsuz yönde etkilemektedir. İBS'li bireyler bu hastalığı taşımayan bireylere göre diyet, konsantrasyon gücünü, normal bir yaşam sürdürebilme, fiziksel görünüş, seyahat, seksüel ve fiziksel ilişkiler konusunda sorun yaşamaktadır. Genel olarak, İBS'li hastaların %78'inin bu sorunlarla karşı karşıya kaldıkları rapor edilmiştir. İBS'li bireyler semptomlar nedeniyle günlük fonksiyonlarını yerine getirme, işe gitme konularında da güçlük çekerler. Bu nedenle, hastalık hem bireyler üzerinde hem de sağlık sektöründe önemli ekonomik harcamalara neden olmaktadır (86). ABD'de her yıl hastalık sebebiyle 2,4-3,5 milyon kişinin doktoru ziyaret ettiği, 2,2 milyon reçete yazıldığı ve hastalığın yıllık maliyetinin 8 milyar dolar olduğu bilinmektedir (87).

Fonksiyonel barsak hastalıklarının sınıflandırılmasında abdominal ağrı ve semptomların sıklıkları esas alınmıştır. Son olarak 2006'da Los Angeles, Kaliforniya'da tanı kriterlerinin son şekli Roma III kriterleri olarak bir sempozyumda sunulmuştur.

İBS'nin patogenezi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Anormal motor fonksiyonu, visseral duyarlılık, gastrointestinal enfeksiyon, psikososyal faktörler ve genetik faktörlerin İBS semptomlarının patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir. Aynı zamanda hastalığın patogenezinde beyin-barsak aksındaki düzensizliğin de rol aldığı düşünülmektedir. Enterik sinir sistemi gastrointestinal boşlukla iletişim içerisindedir. Enterik sinir sistemi, düz kasların kasılması, barsaklardan suyun ve elektrotların geçişi, intestinal sekresyon gibi olayları yönlendirmektedir (85,88).

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, birçok genetik faktörün İBS'nin klinik belirtileri ve etiolojisinde rol oynayabileceğini ileri sürmektedir fakat bu bilgi yeterli olmakla birlikte yapılan çalışmalarda çevresel faktörlerin de İBS ile ilişkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, elde edilen veriler, İBS'nin kompleks genetik bir rahatsızlık olduğuna işaret etmektedir. Genetik faktörlerin hastalık üzerindeki etkisini değerlendirebilmek için gen polimorfizmlerine dayalı çalışmalar yapılmıştır (1,37).

SNP'ler (Single Nucleotid Polymorphisms), DNA dizisindeki varyasyonlardır ve genomdaki tek nükleotid değişimleri sonucu meydana gelirler. Bir varyasyonun SNP

olarak kabul edilebilmesi için, populasyonda en az %1 oranında görülüyor olması gerekir. SNP'ler insan genetik varyasyonlarının %90'ını oluşturmaktadır. Çoğu SNP'ler fenotipik değişimlere yol açmazken, bazıları ise hastalığın oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Farklı tipteki bu SNP'ler, bir proteinin fonksiyonu veya regülasyonu ve ekspresyonunu değiştirebilir. Kodlama bölgesindeki SNP'ler a.a değişimine yol açarak protein fonksiyonunu değiştirebilmektedir. Bazı SNP'ler ise, mRNA splice bölgelerinde meydana gelen polimorfizmlerdir ve ekzon içerikleri farklı varyant proteinlerin sentezlenmesine neden olmaktadır. Pek çok SNP'nin hücresel fonksiyon üzerine bir etkisi yok iken, bir kısmının hastalıklarda, ilaçlara cevapta ve hücresel aktivitelerde etkisi olduğu gösterilmektedir (89,90).

IL-10 gen polimorfizmi (-1082G/G) IL-10 yapımında artış ile sonuçlanır. Gonsalkorale ve ark. (2003) yaptığı çalışmada, İBS hastalarında G/G polimorfizmini kontrol grubuna göre daha az olarak gözlemlediler. Böylece IL-10 genotipi ile İBS gelişimi arasında bir ilişki olduğunu saptadılar. 2012 yılında Meksika'da yapılan çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (91).

İBS'de en çok çalışılmış polimorfizm 5-HTTLPR'dir. Bu polimorfizm sonrası kısa (s) ve uzun (l) allel oluşumu gözlenir. Kısa allel, transkripsiyonel etkinliğin azalması ve dolayısıyla gen ekspresyonunun etkinliğinin azalması ile ilişkilendirilmektedir (87).

Pata ve ark. (2004), s/s homozigot polimorfizmlerinin kabızlık tipi (İBS-D), l/s heterozigot polimorfizmlerinin de konstipasyon tipi (İBS-C) için risk faktörü olduğunu göstermiştir. Yeo ve ark. (2004) tarafından Amerika'da yapılan bir başka çalışmada ise, homozigot s/s polimorfizminin bayanlarda kabızlık tipi İBS (İBS-D) ile ilişkili olduğu saptanmıştır (92).

Serotonin (5-HT), sindirim sistemi motilitesi, visseral duyarlılık ve sekresyonu teşvik eden enterik sinir sisteminde yer alan bir nörotransmitterdir. İBS patofizyolojisindeki rolü, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, İBS hastalarında serotoninin yüksek miktarlarda görülmesiyle desteklenmektedir. Bilinen 13 serotonin reseptörü arasından 6 tanesi gastrointestinal yolda iyi tanımlanmıştır (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5HT-3,5-HT₄, and 5-HT₇). Bunlardan 5-HT_{2A}, gastrointestinal boşlukta da yer alır ve düz kas kasılması ve abdominal ağrı algısının düzenlenmesinde görev alır. 5-HT_{2A} geninde saptanan -1438 G/A polimorfizmi, genin promotor

bölgesinde lokalizedir ve transkripsiyon değişim nedeniyle reseptör sayısını etkilemektedir. AA genotipinin ise, İBS için risk faktörü oluşturduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır (93,94).

Karling ve ark. (2011) yapmış olduğu bir başka çalışmada ise, COMT geni val158met polimorfizminin İBS için bir risk faktörü olduğunu saptamıştır (95).

Yunanca leptos: ince kelimesinden türetilmiş olan leptin, ilk olarak 1994 yılında obez farelerden klonlanarak elde edilmiştir. Leptin başta adipoz dokuda olmak üzere düşük oranlarda da olsa plasenta, ovaryum, memeli epiteli, kemik iliği ve lenfoid dokuları kapsayan birçok dokuda eksprese edilmektedir. Leptin, işlevini, adipoz doku, mide, barsak, endometriyum, karaciğer, akciğer, dalak, kalp, overler ve plasenta da yer alan leptin reseptörleri aracılığı ile yerine getirmektedir (96).

Leptinin keşfinden bir yıl sonra Tartaglia ve ark. (1995) tarafından keşfedilen leptin reseptör geni kromozom 1'de lokalizedir (5). Leptin reseptör geninin farklı splicing'i sonucu en az 6 leptin reseptör izoformu tanımlanmıştır. Uzun leptin reseptör izoformu, merkezi sinir sisteminde, nöropeptid ve nörotransmitterlerin sekresyonundan sorumlu bölgede eksprese edilir ve iştah, vücut ağırlığı ve enerji homeostazını düzenler. Ayrıca endotelyal hücreler, pankreatik beta hücreleri, ovaryum, kemik iliği öncül hücreleri, monosit/makrofaj, T ve B hücrelerinde de eksprese edilir (97). Kısa leptin izoformu ise periferel dokularda eksprese edilmektedir. Leptinin uzun reseptör izoformuna bağlanması, çeşitli hücre içi sinyal ileti yollarının aktivasyonu ile birçok hücrenel işlevin düzenlenmesine neden olur (98).

Bu yollardan en çok çalışılmış olan JAK/STAT yolağıdır. Diğer sitokin reseptörleri gibi, leptin reseptörleri de intrinsik kinaz aktivitesinden yoksundurlar. Leptinin leptin reseptörüne bağlanmasını takiben, Janus tirozin kinazlar aktif hale gelir, hem kendilerini hem de uzun leptin izoformunda yer alan tirozin rezidülerini fosforillerler. Böylece down-stream proteinler için bağlanma bölgeleri oluştururlar. Sitoplazmik adaptörlerin bağlanma bölgesi olan uzun izoformda 3 fosforile tirozin rezidüsü vardır. Bunlar; Tyr⁹⁸⁵, Tyr¹⁰⁷⁷, Tyr¹¹³⁸ rezidüleridir. Bu rezidüler, fosforile olduklarında farklı downstream sinyal proteinleri için bağlanma bölgesi oluştururlar (99).

Bu protein gruplarından biri olan STAT3 proteinleri, c-myc, cyclin D1, p21waf2, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi hücre büyümesi ve hücre proliferasyonunda gerekli olan çok sayıda genin ekspresyonunu düzenlemektedir (8).

JAK/STAT yolağından başka leptin, MAP kinaz, AMP kinaz, PI3K yollarını da aktif hale getirebilmektedir. Bu yollarında da önemli görevler üstlenmektedir. Örneğin; MAP kinaz yolağında çeşitli hücrelerin proliferasyonu ve diferansiyasyonunda görev alan genlerin ekspresyonunu düzenlemekte ve apoptozu indüklemektedir. AMP kinaz yolağında başlıca görevi; iskelet kasında yağ asit oksidasyonunu indüklemektir ve PI3K yolağında ise hipotalamusta enerji homeostazını ve nöroendokrin fonksiyonları düzenleyerek leptinin insülin direnci üzerindeki etkisine aracılık eder (100).

Leptinin en iyi bilinen fonksiyonu, besin alınımı ve enerji metabolizmasını düzenlemektir. Leptin hipotalamik reseptörleri aracılığı ile besin alınımını uyararak Nöropeptid Y'nin (NPY) salınımını inhibe eder. Böylece iştah azalmasına ve sempatik sinir sisteminin aktive olmasına ve enerji kullanımında artışa yol açar. Bunun yanında, iştah metabolizmasını azaltarak etki gösteren melanosit stimüle edici hormonun (MSH) seviyesini arttırarak iştahın azalması yönünde etki gösterir (101).

Leptin, besin alınımı ve enerji metabolizmasını düzenlemesinin yanında, çeşitli hücre tiplerinin proliferasyonunu uyarır ve bu nedenle bir büyüme faktörü olarak da değerlendirilmektedir. Bunların yanı sıra leptin, immünite, anjiyogenez, üreme ve kan basıncının düzenlenmesinde de işlev görmektedir. Anjiyogenez üzerindeki etkisini vasküler endotelial growth faktör (VEGF) ve fibroblast growth faktör 2 (FGF2) ile etkileşime girerek gösterir. Leptin, diyabet, hipertansiyon, anormal tiroid fonksiyonu, arteriosklerozis, pre-eklemlia gibi birçok hastalığın patogenezinde de rol almaktadır (101,102).

Leptin ve leptin reseptörlerinin bu çok yönlü biyolojik işlevleri dikkate alındığında pek çok hastalığın patogenezinde rol alabileceği görülmektedir. Buradan yola çıkarak İBS ile leptin (rs17151919) ve leptin reseptör (rs3790434) gen polimorfizmleri arasında bir ilişkinin var olup olmadığı araştırma hipotezini oluşturmaktadır. Ayrıca barsak hücreleri yüzeyinde leptin reseptörlerinin yer alması, leptin ve/veya leptin reseptörü oluşumdan sorumlu genlerde meydana gelebilecek herhangi bir defekt ile İBS arasında bir ilişki olabileceği fikrini akla getirmektedir.

Leptin (rs17151919) ve leptin reseptör (rs3790434) gen polimorfizmleri ile İBS arasındaki ilişkinin incelendiği bu çalışmada elde edilen veriler aynı zamanda Mersin ili örnekleminde Türk popülasyonuna ait verileri oluşturmaktadır.

Leptin ve leptin reseptör geni polimorfizmlerinin araştırıldığı bu çalışmada, kontrol ve hasta gruplarından alınan kan örneklerinden elde edilen DNA'lardan ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu ve genotiplendirilmesinde Real-Time PCR yöntemi kullanıldı. Klasik PCR ve restriksiyon enzim kesimine dayalı geleneksel yöntemler ile karşılaştırıldığında Real-time PCR ile genotiplendirme yöntemi birçok avantaja sahiptir. Bunlar:

1. Konvansiyonel PCR "plato fazında" yani son noktada değerlendirilebilir, Real-time PCR esnasında "ekponansiyel büyüme fazında" data gözlemlenebilir.
2. Floresan sinyalin gücü doğrudan çoğaltılan ürün miktarı ile orantılıdır.
3. PCR sonrası elektroforez gerektirmez.
4. İki kat artmış değişimi belirleyebilme hassasiyetindedir.

Bu araştırmadan elde edilen verilere göre leptin polimorfizmine (rs17151919) ait allel frekansları ve genotip oranları değerlendirildiğinde; GG genotipinin görülme sıklığı hem kontrol grubunda (n=159) hem de İBS'li hastalarda (n=104) % 100 olarak saptandı. GA ve AA genotipine her iki grupta da rastlanmadı. Tüm bireyler aynı genotipin görülmesi üzerine, genotiplendirme de PCR ve RFLP yöntemine başvuruldu. Birçok örnek elektroforez yöntemi ile agaroz jel üzerinde yürütüldükten sonra 240 nm dalga boyundaki UV görüntüleme cihazı kullanılarak genotip belirlendi. Aynı sonuçlara ulaşıldı. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark olmaması nedeniyle leptin polimorfizmi ile İBS arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Yapılan literatür araştırmalarında leptin (rs17151919) polimorfizmi daha önce obezite, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklarda çalışılmış fakat İBS ile ilişkisi araştırılmamıştır.

Enns ve ark. (2011) Afrika, Amerika ve Kafkaslı bireyler üzerinde yapmış oldukları çalışmada, leptin (rs17151919) polimorfizminin obezite ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (103).

Benzer şekilde Friedlander ve ark. (2010) yaşları 18-30 arasında değişen toplam 4302 birey üzerinde yapmış oldukları çalışmada, leptin polimorfizminin obezite ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (104).

Hoek ve ark. (2006) ise yaptıkları çalışmada, hamile bayanlarda val94met dönüşümünün pre-eklampsi ile ilişkili olmadığını belirtmişlerdir (105).

Çalışmamız bu polimorfizmin IBS ile ilişkisini belirlemek amacıyla yapılan ilk çalışmadır. Verilerimiz Mersin örnekleme temelinde Türk popülasyonunda leptin ile IBS arasında bir ilişki olmadığını ortaya koymaktadır. Araştırmanın farklı toplumlarda ve daha fazla birey üzerinde çalışılarak doğrulanması gerekmektedir.

Leptin reseptör polimorfizmine (rs3790434) ait genotip oranları değerlendirildiğinde; kontrol grubunda 22 bireyin GG, 49 bireyin GA, 33 bireyin ise AA genotipine sahip olduğu, hasta grubunda ise, 37 bireyin GG, 73 bireyin GA ve 49 bireyin AA genotipine sahip olduğu saptandı. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda kontrol ve hasta arasında anlamlı bir fark olmaması nedeniyle leptin reseptör polimorfizmi ile IBS arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Yapılan literatür çalışmalarında IBS'de daha önce çalışılmamış olan bu polimorfizmin başka hastalıklarla ilişkili olduğu gözlenmiştir:

Bienertova ve ark. (2009), Çek popülasyonunda yaşları 21-91 arasında değişen ve kalp yetmezliği olan 372 birey üzerinde yaptıkları çalışmada leptin reseptör Gln223Arg polimorfizminin, hastalıkla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (106).

Duarte ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, Brezilyada, LEPR Q223R varyantının obezite riskini %58 arttırdığını saptanmıştır (107).

Cleveland ve ark. (2010), 1508 meme kanseri ve 1273 sağlıklı birey üzerinde yaptıkları çalışmada LEPR Q223R polimorfizmi ile meme kanseri arasında bir ilişki saptanmadı. Yine aynı çalışmada LEP -2548 polimorfizminin meme kanseri gelişiminde % 30 risk faktörü olduğunu belirlemişlerdir (108).

Karimi ve ark. (2011) yaptığı çalışmada, İran popülasyonunda LEPR Gln223Arg polimorfizmi ile kolorektal kanser arasındaki ilişkiyi araştırdılar ve bu polimorfizm ile kolorektal kanser arasında herhangi bir ilişki olmadığını saptadılar (109).

Hansel ve ark. (2009) yapmış oldukları çalışmada, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ile LEPR polimorfizmleri arasında ilişki olduğunu saptadılar. Ayrıca bu

hastalıkların gelişiminde LEPR'ünün aday gen olarak rol alabileceğini ileri sürmektedirler (110).

Leptin reseptör polimorfizminin İBS ile ilişkisi de ilk defa çalışmamızda yer almıştır ve İBS ile bu polimorfizm arasında da herhangi bir ilişki saptanamamıştır.

Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda birçok hastalığın moleküler patogeneğinde rol alan leptin (rs17151919) ve leptin reseptör (rs3790434) gen polimorfizmleri ile İBS arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı. Leptin ve leptin reseptör gen polimorfizmlerinin İBS'li hastalarda daha önce çalışılmamış olması nedeniyle elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İrritabl Barsak Sendromu (İBS), herhangi bir yapısal ya da biyokimyasal değişim ile açıklanamayan, kronik veya tekrarlayan ağrı veya rahatsızlık, karın şişkinliği ve barsak hareketlerinin değişimi ile karakterize edilen fonksiyonel bir barsak hastalığıdır. Hastalığın patogenezinde çeşitli faktörlerin rol aldığı öngörülmekle birlikte tam olarak hastalığa neden olan etken veya etkenler belirlenebilmiş değildir. Son zamanda yapılan çalışmalar, hastalığın genetik faktörler nedeniyle ortaya çıktığı yönündedir.

Çalışmamızda birçok hücre içi sinyal yolağında görev alan ve çeşitli hastalıkların patogenezinde görev aldığı bilinen Leptin ve Leptin reseptör gen polimorfizmleri ile İBS arasında bir ilişki olup olmadığı araştırıldı. 159 İBS'li hasta ve 104 kontrol grubu ile yapılan çalışmada, Real-time PCR yöntemi kullanarak elde ettiğimiz veriler doğrultusunda başta JAK/STAT yolağı olmak üzere önemli hücre içi yolaklarda görev alan bu polimorfizmler ile İBS arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı ($p < 0.005$). Çalışma popülasyonunun artırılması, leptin ve leptin reseptörüne ait diğer polimorfizmlerin de çalışılması ya da tüm gen bölgesi için SNP analizinin yapılması, her iki gen için de olası ekspresyonel ve epigenetik değişimlerinin belirlenmesi ve ilgili sinyal yollarındaki işlevsel moleküllerinde çalışmaya dahil edilmesiyle leptin ve leptin reseptörlerinin İBS etiyopatogenezindeki olası rolleri aydınlatılabilecektir.

Çalışmamız, leptin ve leptin reseptör genine ait sırasıyla rs17151919 ve rs3790434 polimorfizmlerin genotip frekans ve allel oranlarının Mersin ili kapsamında Türk popülasyonundaki ilk verilerini oluşturmaktadır. Ayrıca İBS de leptin ve leptin gen polimorfizmlerinin daha önce çalışılmamış olması nedeniyle elde edilen verilerin literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Camilleri M.** Genetics and Irritable Bowel Syndrome: From Genomics to Intermediate Phenotype and Pharmacogenetics. *Dig Dis Sci*, **2009**; 54:2318-2324.
2. **Yao X, Yang YS, Cui L.H, Zhao KB, Zhang ZH, Peng LH, Guo X, Sun G, Shang J, Wang WF, Feng J, Huang O.** Subtypes of irritable bowel syndrome on Rome III criteria : a multi-center stud. *J Gastroenterol Hepatol*, **2012**;27(4):760-5.
3. **Rey E, Talley NJ.** Irritable bowel syndrome: Novel views on the epidemiology and potential factors. *Digestive and Liver Disease*, **2009**;41: 772-780.
4. **Sone M, Osamura RY.** Leptin and the Pituitary. *Pituitary*, **2001**; 4:15–23.
5. **Zhang Z, Chen Y, Heiman M and Dimarchi R.**Leptin: Structure, Function and Biology. *Vitamin and Hormons*, **2005**; 71:345-72
6. **Fruhbeck G.** Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem. J*, **2006**; 393: 7–20.
7. **Robertson SA, Leininger GM, Myers GM.** Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiology & Behavior*, **2008**; 94: 637–642.
8. **Cirillo D, Rachiglio AM, Montagna RL, Giordano A, Normanno N.** Leptin Signaling in Breast Cancer: An Overview. *Journal of Cellular Biochemistry*, **2008**;105: 956–964.
9. **Howard JK, Flier JS.** Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **2006**; 17(9): 365-71.
10. **Posserud I.** Peripheral and central factors in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. Section of Gastroenterology and Hepatology Department of Internal Medicine Sahlgrenska University Hospital, Göteborg University, Göteborg, Sweden, **2007**.
11. **Celebi S, Acık Y, Deveci S, Bahçecioglu H, Ayar A, Demir A, Durukan P.** Journal of Gastroenterology and Hepatology. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **2004**; 19:738–743.
12. **Kajander K.** Pathophysiological factors of irritable bowel syndrome, and the effects of probiotic supplementation. Faculty of Medicine of Biomedicine, Pharmacology University of Helsinki, Finland, **2008**.

13. **Bursey F.** Irritable bowel syndrome. *The Canadian Journal of CME*, **2001**;105-112.
14. **Talley NJ, Spiller R.** Irritable bowel syndrome: a little understood organic bowel disease? *Lancet*, **2002**; 360: 555–64.
15. **Lea R and Whorwell PJ.** Quality of Life in Irritable Bowel Syndrome, *Pharmacoeconomics* **2001**; 19 (6): 643-653.
16. **Choung RS, Locke GR.** Epidemiology of IBS. *Gastroenterol Clin N Am*, **2011**; 40:1-10.
17. **Gregersen H, Drewes AM.** Functional findings in irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*, **2006**; 18: 2830-2838.
18. **Chang FY and Lu CL.** Irritable bowel syndrome in the 21st century: Perspectives from Asia or South east Asia. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **2007**; 4–12.
19. **Hulsz D.** The Burden of Illness of Irritable Bowel Syndrome: Current Challenges and Hope for the Future. *J Manag Care Pharm*, **2004**; 10(4): 299-309.
20. **Cash BD, Chey WD.** Review article: irritable bowel syndrome – an evidence-based approach to diagnosis. *Aliment Pharmacol Ther*, **2004**; 19: 1235–1245.
21. **Weiser KT, Kennedy AT, Lacy BE, Lacy BA.** Evolving Issues in the Diagnosis, Evaluation, and Management of Irritable Bowel Syndrome. *Touch Briefings*, **2008**:70-71.
22. **Drossman DA.** The Functional Gastrointestinal Disorders and the Rome III Process. *Gastroenterology*, **2006**; 130:1377–1390.
23. **Drossman DA, Dumitrascu DL.** Rome III: New Standard for Functional Gastrointestinal Disorders. *J Gastrointestin Liver Dis*, **2006**;15: 237-241.
24. **Mearin F, Balboa A, Badia X, Baro E, Caldwell E, Cucala M, Diaz-Rubio M, Fueyo A, Ponce J, Roset M, Talley NJ.** Irritable bowel syndrome subtypes according to bowel habit: revisiting the alternating subtype. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **2003**; 15(2):165-72
25. **Ersryd A, Posserud I, Abrahamsson H, Simren M.** Subtyping the irritable bowel syndrome by predominant bowel habit: Rome II versus Rome III. *Aliment Pharmacol Ther*, **2007**; 26: 953–961.
26. **Kellow JE.** Pathophysiology and Management of Irritable Bowel Syndrome. *The Korean Journal of Internal Medicine*, **2001**; 19-25.

27. **Heitkemper MM, Jarrett ME.** Update on Irritable Bowel Syndrome and Gender Differences. *Nutrition in Clinical Practice*, **2008**; 23:275-283
28. **Longstret GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC.** Functional Bowel Disorders. *Gastroenterology*, **2006**;130:1480–1491.
29. **Vahedi H, Ansari R, Mir-Nasseri MM, Jafari E.** Irritable Bowel Syndrome: A Review Article. *Middle East Journal of Digestive Diseases*, **2010**;2:66-77.
30. **Liu J and Hou XA.** review of the irritable bowel syndrome investigation on epidemiology, pathogenesis and pathophysiology in China, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **2011**;3: 88–93.
31. **Tanaka Y, Kanazaw M, Fukudo S, Drossman A.** Biopsychosocial Model of Irritable Bowel Syndrome. *J Neurogastroenterol Motil*, **2011**;17:131-139.
32. **Talley N.J.** Genes and environment in irritable bowel syndrome: one step forward. *Gut*, **2006**; 55:1694–1696.
33. **Jha RK, Zou Y, Li J, Xia B.** Irritabl Bowel Syndrome (IBS) At a Glance. *BJMP*, 2010;3(4): 342-48.
34. **Andresen V and Camileri M.** Irritable Bowel Syndrome: Recent and Novel Therapeutic Approaches. *Drugs*, **2006**; 66 (8): 1073-1088.
35. **Gilkin RJ.** The Spectrum of Irritable Bowel Syndrome: A Clinical Review. *Clinical Therapeutics*, **2005**; 27: 1696-1709.
36. **Niesler B, Kapeller J, Fell C, Atkinson W, Möller D, Fischer C, Whorwell P.** 5-HTTLPR and STin2 polymorphisms in the serotonin transporter gene and irritabl bowel syndrome: effect of bowel habits and sex. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, **2010**; 22: 856–861.
37. **Hotoleanu C, Popp R, Trifa AP, Nedelcu L, Dumitrascu DL.** Genetic determination of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*, **2008**; 14(43): 6636-6640.
38. **Whorwell PJ, McCallum M, Creed FH, et al.** Non-colonic features of irritable bowel syndrome. *Gut*, **1986**; 27:37–40.
39. **Park MI, Camileri M.** Genetics and Genotypes in Irritable Bowel Syndrome: Implications for Diagnosis and Treatment. *Gastroenterol Clin N Am*, **2005**; 34:305–317.

40. **Saito YA, Petersen GM, In GRL, Talley NJ.** The Genetics of Irritable Bowel Syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **2005**; 3:1057–1065.
41. **Locke GR 3rd, Zinsmeister AR, Talley NJ, Fett SL, Melton LJ 3rd.** Familial association in adults with functional gastrointestinal disorders. *Mayo Clin Proc*, **2000**; 75: 907-912.
42. **Kanazawa M, Endo Y, Whitehead WE, Kano M, Hongo M, Fukudo S.** Patients and nonconsulters with irritable bowel syndrome reporting a parental history of bowel problems have more impaired psychological distress. *Digestive Diseases and Sciences*, **2004**; 49: 1046-1053.
43. **Morris-Yates A, Talley NJ, Boyce PM, Nandurkar S, Andrews G.** Evidence of a genetic contribution to functional bowel disorder. *Am J Gastroenterol* **1998**; 93: 1311-1317.
44. **Lende TVD, Pas T, Veerkamp RF and Liefer SC.** Leptin Gene Polymorphism and Their Phenotypic Associations. *Vitamins and Hormones*, **2005**; 373-404.
45. **Sweeney G.** Leptin signalling. *Cellular Signalling*. **2002**; 14: 655– 663.
46. **Ünal M.** Leptin. *İst. Tıp. Fak. Mecmuası*. **2004**; 67: 62-67.
47. **Considine R.V, Caro J.F.** Leptin and the Regulation of Body Weight. *Int. J. Biochem Cell Biol*, **1997**; 29: 1255-1272.
48. **Van Der Lende T, Te Pas MFM, Veerkamp RF, Liefers SC.** Leptin Gene Polymorphisms and Their Phenotypic Associations. *Vitamins and Hormones*. **2005**; 71:373-404.
49. **Banks AS, Davis SM, Bates SH. and Myers MG.** Activation of Downstream Signals by the Long Form of the Leptin Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, **2000**; 14563-14572
50. **Das B, Pawar N, Saini D, and Seshadri M.** Genetic association study of selected candidate genes (ApoB, LPL,Leptin) and telomere length in obese and hypertensive individuals. *BMC Medical Genetics*, **2009**; 10:99.
51. Leptin. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LEP&search=rs17151919>. Erişim Tarihi: 15.04.2012.
52. **Paracchini V, Pedotti P and Taioli E.** Genetics of Leptin and Obesity: A Huge Review. *Am J Epidemiol*, **2005**;162:101–114.
53. **Prolo P, Wong M, Licinio J.** Leptin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **1998**;1285-1290.
54. **Arora A, Arora S.** Leptin and its metabolic interactions – an update. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **2008**; 10: 973–993.

55. **Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, Okazaki T, Satoh N, Shigemoto N, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Inazawa J, Nakao K.** Structural Organization and Chromosomal Assignment of the Human Obese Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, **1995**; 46: 27728–27733.
56. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LEPR&search=rs3790434>. Erişim Tarihi: 15.04.2012.
57. **Ahima RS, Osei SY.** Leptin signaling. *Physiology & Behavior*, **2004**; 81: 223– 241.
58. **Sahu A.** Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **2004**; 24: 225–253.
59. **Bates SH, Myers MG.** The role of leptin →STAT3 signaling in neuroendocrine function: an integrative perspective. *J Mol Med*, **2004**; 82:12–20.
60. **Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva F.F, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O.** Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Letters*, **2005**; 579: 295–301.
61. **Thompson DB, Ravussin E, Bennett PH and Bogardus C.** Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. *Human Molecular Genetics*, **1997**; 675–679.
62. **Lahlou N, Issad T, Lebouc Y, Carel J.C, Camoin L, Roger M, Girard J.** Mutations in the Human Leptin and Leptin Receptor Genes as Models of Serum Leptin Receptor Regulation. *Diabetes*. **2002**; 51:1980-1985.
63. **Sahu A.** Intracellular Leptin-Signaling Pathways in Hypothalamic Neurons: The Emerging Role of Phosphatidylinositol-3 Kinase- Phosphodiesterase-3B-cAMP Pathway. *Neuroendocrinology*, **2011**; 93:201–210.
64. **Villanueva and Myers MG.** Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology, *Int J Obes*, **2008**; 32: 8-12
65. **Myers MG, Cowley MA, Munzberg H.** Mechanisms of Leptin Action and Leptin Resistance. *Annu. Rev. Physiol*, **2008**; 70:537–56.
66. **Valentino L, Pierre J.** JAK/STAT signal transduction: Regulators and implication in hematological malignancies. *Biochemical pharmacology*, **2006**; 71:713-721.

67. **Li C And Friedman JM.** Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1996**; 96:9677–9682.
68. **Procaccini C, Lourenco EV, Matarese G, Cava AL.** Leptin signaling: A key pathway in immune responses. *Curr Signal Transduct Ther.* **2009**; 4(1):22–30.
69. **Münzberg H, Björnholm M, Bates SH and. Myers MG.** Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Life Sci*, **2005**; 62, 642–652.
70. **Bjørnbæk C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, Myers MG.** SOCS3 Mediates Feedback Inhibition of the Leptin Receptor via Tyr985. *The Journal of Biological Chemistry*, **2000**; 22: 40649–40657.
71. **Bjørnbæk C, El-Haschimi K, Frantz J.D, Flier J.S.** The Role of SOCS-3 in Leptin Signaling and Leptin Resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, **1999**; 274(42):30059–30065.
72. **Buettner C, Pocai A, Muse ED, Etgen AM, Myers MG and Luciano Rossetti.** Critical role of STAT3 in leptin’s metabolic actions, *Cell Metabolism*, **2006**; 4: 49–60.
73. **Kiu H and Nicholson SE.** Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways, *Growth Factors*, **2012**; 30(2): 88-106.
74. **Dardeno TA, Chou SH, Moon HS, Chamberland JP, Fiorenza CG, Mantzoros CS.** Leptin in human physiology and therapeutics. *Frontiers in Neuroendocrinology.* **2010**; 31: 377–393.
75. **Morris DL and Rui L.** Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2009**; 297: 1247–1259.
76. **Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Foufelle F, Fere P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB.** AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus, **2004**; 428:569-574
77. **Yasuhiko M,** Department of Developmental Physiology, National Institute For Psychological Sciences.<http://www.nips.ac.jp/eng/contens/publication/guide/html/2009/res/developmental.html> Erişim tarihi: 20.04.2012.
78. **Donato J, Frazão R, Elias C.F.** The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. *Arq Bras Endocrinol Metab*, **2010**; 54(7): 591-602.
79. **Pérez AP, Gambino Y, Maymó, Goberna R, Fabiani F, Varone C, Margalet VS.** MAPK and PI3K activities are required for leptin stimulation of protein synthesis in human trophoblastic cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2010**; 396(4): 956–960.

80. **Yarandi SS, Hebbar G, Sauer CG, Cole CR, Ziegler TR.** Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: Modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition*, **2010**; 27(2): 269-275.
81. **Lu H, Li C.** Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Research*. **2000**; 10:81- 92.
82. **Kiely JM, Noh JH, Graewin SJ, Pitt HA and Swartz-Basile DA.** Altered Intestinal Motility in Leptin-Deficient Obese Mice. *Journal of Surgical Research*, **2005**;124: 98–103.
83. **Utsunomiya K. et al.** Lack of Association Between the Leptin Receptor Gene(LEPR) Gln223Arg Polymorphism and Late-onset Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **2010**; 24: 101-103.
84. YakimaYellow. <https://secure.eurogentec.com/product/research-yakima-yellow.html?Sayiry=bel>
Erişim Tarihi: 25.04.2012
85. **Karantanos T, Markoutsaki T, Gazouli M, Anagnou NP and Karamanolis DG.** Current insights in to the pathophysiology of Irritable Bowel Syndrome. *Gut Pathogens*, **2010**; 2:3.
86. **Novartis Pharma AG.** Irritable Bowel Syndrome – Impact and Treatment. *Tecnology and Services*, **2004**;1-5.
87. **Simren M, Brazier J, Coremans G, Dapoigny M, Müller SA, Pace F, Smout AJPM, Stockbrügger RW, Vatni MH, Whorwell PJ.** Quality of Life and Illness Costs in Irritable Bowel Syndrome. *Digestion*, **2004**; 69: 254-261.
88. **Hillilä M.** Irritable bowel syndrome in the general population: epidemiology, comorbidity, and societal costs. Academic Dissertaation, Medical Faculty of the University of Helsinki, Finland, **2010**.
89. **Shastry BS.** SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet*, **2002**; 47: 561-566.
90. **Chanock S.** Candidate genes and single nucleotide polymorphism (SNPs) in the study of human disease. *Disease Markers*, **2001**; 17(2): 89-98.
91. **Diaz AO, Valdovinos MR, Ramirez AG, Gordillo JR, Gonzalez DEJ, Miranda MER, Flores WAM, Hernandez FM, Flisser A, Maravilla P.** Findings related to IL-8 and IL-10 gene polymorphisms in a Mexican patient population with irritable bowel syndrome infected with Blastocystis. *Parasitol Res*, **2012**;10:436-440.

92. **Geeraerts B, Oudenhove V, Tack J.** Serotonin transporter gene polymorphisms in irritable bowel syndrome, *Neurogastroenterol Motil*, **2006**; 18: 957–959.
93. **Markoutsaki T, Karantanos T, Gazouli M, Aagnou NP, Karamanolis DG.** 5-HT2A Receptor Gene Polymorphisms and Irritable Bowel Syndrome, *J Clin Gastroenterol*, **2011**;45: 514-517.
94. **Pata C, Erdal E, Yazıcı K, Camdeviren H, Ozkaya M, Ulu O.** Association of the -1438 G/A and 102 T/C Polymorphism of the 5-Ht2A Receptor Gene with Irritable Bowel Syndrome 5-Ht2A Gene Polymorphism in Irritable Bowel Syndrome, *J Clin Gastroenterol*, **2004**; 38:561–566.
95. **Karling P, Danielsson A, Wikgren M, Soderstrom I, Del-Favero J, Adolfsson R.** Relationship between the Val158Met Catechol-o-Methyltransferase (COMT) Polymorphism and Irritable Bowel Syndrome, *PLoS ONE*, **2011**; 6(3):18035.
96. **Scheller EL, Song J, Dishowitz ML, Soki FN, Hankenson KD, Krebsbach PH.** Leptin Functions Peripherally to Regulate Differentiation of Mesenchymal Progenitor Cells, *Stem Cell* **2010**; 28:1071–1080.
97. **Matarese G, Moschos S, and Mantzoros CS.** Leptin in Immunology, *J Immunol* **2005**;174:3137-3142
98. **Klaffenbach D, Meißner U, Raake M, Fahlbusch F, Alcazar MAA, Allabauer I, Kratzsch J, Rascher W. Dötsch J.** Upregulation of leptin-receptor in placental cells by Hypoxia. *Regulatory Peptides*, **2011**;167(1): 156-62.
99. **Wang SN, Lee KT, Ker CG.** Leptin in hepatocellular carcinoma, *World J Gastroenterol* **2010**; 16(46): 5801-5809.
100. **Yang R, Barouch LA.** Leptin Signaling and Obesity : Cardiovascular Consequences. *Circulation Research*, **2007**, 101:545-559
101. **White BD, Martin RJ.** Evidence for a Central Mechanism of Obesity in the Zucker Rat: Role of Neuropeptide Y and Leptin., *Proc Soc Exp Biol Med* **1997**, 214:222-232.
102. **Várkonyi T, Lázár L, Molvarec A, Than NG, 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.
103. **Enns JE, Taylor CG and Zahradka P.** Variations in Adipokine Genes AdipoQ, Lep, and LepR Are Associated with Risk for Obesity-Related Metabolic Disease: The Modulatory Role of Gene-Nutrient Interactions. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Obesity*, **2011**.

104. **Friedlander Y, Li G, Fornage M, Williams OD, Lewis CE, Schreiner P, Pletcher MJ, Enquobahrie D, Williams M and Siscovick DS.** Candidate Genes from Molecular Pathways Related to Appetite Regulatory Neural Network and Adipocyte Homeostasis and Obesity: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study, *Ann Hum Genet.* **2010**; 74(5): 387–398.
105. **Hoek KGP.** Mutation screening of pre-eclampsia candidate genes, LEP(ob) and LEPR(obR). Postgraduate thesis, University of Stellenbosch, South Africa, **2006**.
106. **Bienertová-Vasku JA, Bienert LSP, Vasku A.** Association between variants in the genes for leptin, leptin receptor, and proopiomelanocortin with chronic heart failure in the Czech population, *Heart Vessels*, **2009**; 24:131–137.
107. **Duarte SPF, Francischetti EA, Genelhu VA, Cabello and Pimentel MMG.** LEPR p.Q223R, β3-AR p.W64R and LEP c.-2548G>A gene variants in obese Brazilian subjects, *Genet. Mol. Res.*, **2007**; 6 (4): 1035-1043.
108. **Cleveland RJ, Gammon MD, Long CM, Gaudet MM, Eng SM, Teitelbaum SL, Neugut AI, Santella RM.** Common genetic variations in the LEP and LEPR genes, obesity and breast cancer incidence and survival, *Breast Cancer Res Treat*, **2010**; 120:745–752.
109. **Karimi K, Arkani M, Safaei A, Pourhoseingholi MA, Mohebbi SR, Fatemi SR, Vafaei M.** Association of leptin receptor gene Gln223Arg polymorphism with susceptibility to colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, **2011**;4(4):192-198.
110. **Hansel NN, Gao L, Rafaels NM, Mathias RA, Neptune ER, Tankersly C, Grant AV, Connett J, Beaty TH, Wise RA, Barnes KC.** Leptin receptor polymorphisms and lung function decline in COPD. *Eur Respir J*, **2009**; 34: 103-110.

ÖZGEÇMİŞ

Kenan Çevik, 1985 yılında Erzincan'da doğdu. İlk ve orta öğretimimi Serdar Aksun İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Liseyi Refhan Tümer Lisesi'nde tamamladı. 2004-2009 yılları arasında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Lisans eğitimi aldı. 2009 yılı Eylül ayında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladı. 2012 yılı Ekim ayında aynı Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak atandı. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime ve görevime devam etmektedir.