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

IRS 2 GEN POLİMORFİZMİ İLE OBEZİTE ARASINDAKİ İLİŞKİ

Ayşe KUBİLAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

MERSİN-2010

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

IRS 2 GEN POLİMORFİZMİ İLE OBEZİTE ARASINDAKİ İLİŞKİ

Ayşe KUBİLAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP SBE (AK) 2009-1 YL kodlu proje kapsamında desteklenmiştir.

Tez No:

MERSİN - 2010

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tez Programı çerçevesinde yürütülmüş olan "IRS 2 Gen Polimorfizmi İle Obezite Arasındaki İlişki" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 15/06/2010

Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Serap YALIN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ömer BARLAS
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 24/06/2010 tarih ve 2010/186 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince yardım ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Sn. Doç. Dr.Nurcan ARAS ATEŞ'e teşekkür ederim.

Anabilimdalı başkanımız Sn. Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a ve hocalarımız Sn. Doç. Dr. Etem AKBAŞ' a, Sn. Doç. Dr .İ. Ömer BARLAS'a, Sn.Yrd. Doç. Dr .M.Ertan AY'a, Sn.Yrd. Doç. Dr .Özlem İZCİ AY'a yüksek lisans eğitimim süresince aldığım derslerde verdikleri bilgilerle yaptıkları akademik katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Tezim için çalışma grubu oluşturmam konusunda sağladıkları destekten dolayı Türk Diyabet Cemiyeti Özel Mersin Hastanesine ve üniversitemiz İç Hastalıkları A.B.D öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. Esen AKBAY'a teşekkür ederim Tezimin istatiksel analizinde ve bulguların değerlendirilmesi konusunda yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilimdalı öğretim görevlisi Sn. Semra ERDOĞAN'A ve destek olan çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni destekleyen babama ve anneme teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY…… iii
TEŞEKKÜR……...… iv
İÇİNDEKİLER…… v
ŞEKİLLER DİZİNİ……. vii
ÇİZELGELER DİZİNİ…… viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ …… ix
ÖZET…… xi
ABSTRACT…… xii
1.GİRİŞ……1
2.GENEL BİLGİLER……. 3
2.1. Obezite……3
2.2. Besin Alımının Düzenlenmesi…… 7
2.3. Obezite'nin Etiyolojisi ve Etkileyen Faktörler ……. 9
2.3.1. Nöroendokrin Obezite……9
2.3.2. İlaç Kullanımının Neden Olduğu Obezite…… 10
2.3.3. Diyete Bağlı Obezite…… 10
2.3.4.Azalmış Enerji Harcaması..……..……..……... 10
2.3.5. Genetik Nedenler …… 12
2.3.5.1. Monogenik Obezite …… 13
2.3.5.2. Poligenik Obezite…… 18
2.4. IRS Gen Ailesinin Üyeleri……18
2.5. IRS 2 Geni ve Proteini……..20
2.6. IRS 2 'nin Vücuttaki Dağılımı…… 21
2.7. İnsulin Reseptör Substrat– Fosfatidilinozitol 3-Kinaz MetabolikYolu…… 23
2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR) Tekniği…….. 24
2.8.1. PCR'nin Evreleri……. 27
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER ……29
3.1. Kullanılan Cihazlar …… ……... 29
3.2. Kullanılan Kimyasallar …… 30
3.3. DNA İzolasyonu için kullanılan Çözeltiler …….. 30

3.4. DNA İzolasyonu…… 32
3.5. Moleküler Analiz…… 33
3.6. Verilerin Değerlendirilmesi…… 34
3.7. İstatiksel Analiz……35
4. BULGULAR …… 36
5.TARTIŞMA ……... 42
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER…….. …...47
7.KAYNAKLAR ……..…… 48
8.ÖZGEÇMİŞ……..51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Besin alımının düzenlenmesi… ……..……..8
Şekil 2.2. Obezite'ye neden olan genetik nedenler……12
Şekil 2.3. IRS 2 üç boyutlu yapısı ……....22
Şekil 2.4. İnsülin sinyal yolları…… ..23
Şekil 4.1. PCR-RFLP sonrasında IRS 2 geni fragmentlerinin agaroz jelde görünümü ……...…. 36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. BKİ'ye göre obezite'nin sınıflandırılması ……..…. 4
Çizelge 2.2. Obezite ile ilgili genetik sendromlar……. 14
Çizelge 2.3. Monogenik obezite de rol alan genler …….. 17
Çizelge 4.1. Obez ve kontrol gruplarına yaş ve BKİ ortalamaları…… 37
Çizelge 4.2. Obez ve kontrol gruplarına ait genotip frekansları…… 37
Çizelge 4.3. Obez ve kontrol gruplarına ait allel frekansları…….. 38
Çizelge 4.4. G1057D polimorfizmi genotiplerinin obezite ile ilişkisini gösteren OR (odds oranı) ve p değerleri……. 38
Çizelge 4.5. Cinsiyete göre obez ve kontrol grupları…… 38
Çizelge 4.6. Cinsiyete göre genotiplerin dağılımı…… 39
Çizelge 4.7. Cinsiyete göre allel frekansları…… 39
Çizelge 4.8. Obezite BKİ'ye göre sınıflandırılması……40
Çizelge 4.9. Obez grubun genotiplerine göre BKİ dağılımı……. 40
Çizelge 4.10. Obez grubun BKİ'sine göre allel frekansları …… 41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Abl…… Abelson Murine Lösemi Virus
ACTH……Adrenokortikotropin
AgRP…….Agouti Gen İlgili Peptid
α-MSH……...Alfa Melanosit Stimüle Edici Hormon
BBS……....Bardet-Biedl Sendromu
BDNF…….Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
BKİ ……Beden Kitle İndeksi
bp ……...Baz Çift
c DNA……Komplementer DNA
Csk…….C-Src Tirozin Kinaz
DNA…….. Deoksiribonükleik Asit
dNTP …….Deoksiribonükleozid Trifosfat
EDTA…….EtilendiamineTetra Asetik Asit
HDL…… Yüksek Dansiteli Lipoprotein
Grb-2…… Büyüme faktör reseptörüne bağlanma proteini 2
IGF-1……..İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IGF-IR …… İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-İnsülin Reseptörü
IR……İnsülin Reseptörü
IRS…… İnsülin Reseptör Substrat
Kb…… Kilo Baz
Kd …… Kilo Dalton
LEPR …… Leptin Reseptörü
LDL……Düşük Dansiteli Lipoprotein.
M …… Molarite
LHRH …… Lutein Hormon Çıkarma Hormonu
MC4R …… Melanokortin 4 Reseptörü
mg…… Miligram
µl…….Mikrolitre

ml …….....Mililitre

MAP…….....Mitojen Aktive Protein

MAPK .....Mitojen Aktive Protein Kinaz

MCH …….…….....Melanin Yoğunlaştırma Hormonu

$MgCl_2$…….....Magnezyum Klorür

NaCl …….Sodyum Klorür

NPY .....Nöropeptid Y

NTRK2. ……Nörotropik Tirozin Kinaz Reseptör 2

PC1…….. .Prohormon konvertaz1 enzimi

PCR……Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PDK……...PIP3 Bağımlı Kinazlar

PH..... ……..Pleckstrin Homoloğu

PIP2 ……..Fosfatidil İnositol - 4,5- Bifosfat

PI -3-kinaz……....Fosfotidilinozitol -3- Kinaz

PIP3……Fosfotidilinozitol Trifosfat

PKB.....Protein Kinaz B

POMC ……..Pro-Opiomelanokortin

PWS …….....Prader –Willi Sendromu

RFLP …….Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

RNA .....Ribonükleik Asit

SDS……Sodyum Dodesil Sülfat

SHGB……....Seks Hormonu Bağlayıcı Globülin

SIM 1…….Single-Minded Homolog 1

SH-2 ……. ……...Src Homoloji 2

SHP-2 …….....Src Homoloji-2 İçeren Tirozin Fosfataz-2

SNP …….....Tek Nükleotid Polimorfizmi

Taq:……..……..……Termo Stabil Polimeraz Enzimi

Tris-HCL…….....Tris-Hidroklorür

ÖZET

IRS 2 Gen Polimorfizmi İle Obezite Arasındaki İlişki

Obezite, yaygın görülen bir sağlık sorunu olup bedendeki yağların aşırı birikmesi olarak tanımlanır. Besinlerin bolluğu ve beslenme tarzının değişmesi sonucunda obezite dünyada epidemik duruma gelmiştir ve ciddi sağlık problemlerine yol açmaktadır.

İnsülin reseptörü substrat 2 (IRS-2) geni kromozom 13 q34.1'de haritalanmıştır ve insülin reseptörünün önemli substratlarından birisidir. Pankreasın beta hücrelerinin gelişiminde, canlılığını sürdürmesinde ve insülin sinyal sisteminde önemli rol oynar. IRS-2 geni insanlarda polimorfizm gösterir ve bu polimorfizmlerin IRS-2 proteininde aminoasit değişikliğine neden olan, kodon 1057'de guaninin adenine değişimi şeklinde olduğu belirlenmiştir. Bu allel HaeII restriksiyon enzimi kullanılarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizleri ile tanımlanabilir.

Bu çalışmada, IRS-2 gen polimorfizmi ile obezite arasında ilişkiyi incelemek amaçlanmıştır. PCR-RFLP yöntemi ile 99 obez ve 100 kontrol grubunda genotiplemesi yapılmıştır. Homozigot yabanıl genotip (G/G), heterozigot (G/D) ve homozigot mutant (D/D) genotiplerinin dağılımı obez grupta % 50,5, % 36,4 , % 13,1 obez olmayan grupta ise% 51, % 38, % 11 olarak saptanmıştır. Obez ve kontrol grubu arasında, IRS-2 genotipleri açısından bir fark saptanmamıştır.

IRS-2 gen polimorfizmi ile obezite için risk faktörü olarak değerlendirilen çevresel faktörlerle birlikte yapılacak olan bir çalışma ile daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

Anahtar Sözcükler : IRS 2 Geni, Obezite, Genetik Polimorfizm

ABSTRACT

Association Between IRS 2 gene polymorphism and Obesity

Obesity is a common health problem. obesity has become epidemic situation in the world . As a result of abundance of nutrients and dietary changes and it leads to serious health problems.

IRS 2 has been mapped to chromosome 13 q34.1. Insulin receptor substrate-2 (IRS-2), one of the major substrates of the insulin receptor, has a crucial role in insulin signalling and in beta cell development and survival. IRS 2 gene has also been found to be polymorphic in humans with an G→A substitution at codon 1057 causing amino asid changes of the IRS 2 protein. The allelles could be identified with a PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis using the restriction enzyme Hae II.

In this study we aimed to investigate the effects of IRS 2 genotype on obesity. Genotyping of 99 obese and 100 healty volunteers people were carried out using PCR-RFLP method. The distributions of the G/G, G/D, D/D genotypes were 50.5%, 36,4 %, 13,1 %, respectively, in the obese people and 51.0%, 38.0 %, 11.0 %, in the nonobese people. No differences in IRS 2-GG, IRS 2-DD, IRS2 -GD polimorphism were detected between obese and non obese groups

In conclusion, future studies on the interaction of IRS-2 polymorphism with various environmental factors in the evaluations of obesity risk may lead to statisically significant data.

Key Words : IRS 2 Gene, Obesity, Genetic Polymorphism.

1.GİRİŞ

Obezite bedendeki yağların aşırı birikmesi ile karakterize bir durumdur. Günümüzde kronik bir hastalık olarak kabul edilen obezite, sigaradan sonra ikinci önlenebilir ölüm sebeplerinden birisidir (1). Besinlerin yetersiz olduğu durumlarda, memelilerin canlılığını sürdürebilmesi ve besinlerin depolanması için evrimsel süreç içerisinde bazı mekanizmalar gelişmiştir. Besinlerin bollaşması ve beslenme tarzının değişmesi sonucunda dünyada obezite epidemik duruma gelmiştir (2). Yetişkin obez birey sayısının 2005'de 400 milyon iken, 2015'de 700 milyondan fazla olacağı tahmin edilmektedir (3). Dünya sağlık örgütü, 2005 yılında epidemik hastalıklar arasında obeziteyi birinci sıraya koymuştur (4).

Obezitenin tanımlanması ve gruplara ayrılmasında kullanılan en önemli kr
iter beden kitle indeksinin hesaplanmasıdır. Beden kitle indeksi (BKİ) 30 kg/m^2 ve üzerinde ise birey obez olarak kabul edilmektedir. BKİ 25 ile 29.9kg/ m^2 değeri aşırı kilo, 30–34.9 kg/ m^2 sınıf I obezite, 35–39.9 kg/ m^2 sınıf II obezite, 40 kg/m^2 ve üzeri sınıf III aşırı obezite olarak sınıflandırılmıştır (1).

Obezite ciddi sağlık problemlerine yol açmaktadır. Bunlar tip 2 diyabet, sistemik hipertansiyon, dislipidemi, inme, miyokard infarktüsü, koroner kalp hastalığı, konjektif kalp yetmezliği, uyku apnesi, depresyon, kanser, gastroözofageal reflü gibi hastalıklardır (2).

Adipoz dokusu, uzun bir süre yalnız yağ depo etmekle görevli inaktif bir doku olarak görülmüştür (1, 5). Günümüzde salgıladığı çok sayıda potansiyel düzenleyici molekül ile doğrudan ve aktif bir şekilde vücut ağırlığının ve enerji dengesinin kontrol edildiği yer olarak görülmektedir. Bu salgılanan moleküllerin belirlenmesi ile vücudun aşırı yağ depo etmesi ve diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi metabolik bozukluklar arasındaki ilişkinin biyolojik mekanizmaları açığa kavuşmuştur.

İnsülin reseptör substrat protein (IRS) ailesi, insülin sinyal sisteminde anahtar rol oynayan aracı moleküllerdir. IRS altı üyeden meydana gelmektedir. Bunlardan yalnızca dört üyesi hakkında yeterli bilgi bulunmaktadır.

IRS-2 geni, 13 numaralı insan kromozomunun q34.1 bandında bulunur. IRS-2 proteini beyin, karaciğer, kas, kalp, adipoz, böbrek, ovaryum ve meme bezlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Beynin hipotalamus bölgesindeki nöral insülin

reseptörüne bağlanmasıyla bir dizi fosforilasyon ve defosforilasyon tepkimeleri meydana gelmektedir. İnsülinin reseptöre bağlanması ile IRS-2 proteinin aracılık ettiği IRS – Fosfotidilinozitol -3- kinaz sinyal yolu aktifleşir ve besin alımı ve vücut ağırlığı kontrol yolu da aktifleşmiş olur (5).

Bu çalışmada, IRS-2 gen polimorfizmi çalışılarak toplumumuzdaki sıklığı ve obezite ile genetik ilişkilerinin araştırılarak genetik yatkınlığın belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Obezite

Obezite, vücudun aşırı yağ depo etmesi sonucu meydana gelen bir hastalıktır. Büyük ve farklı populasyonlarda yapılan çok sayıdaki epidemiyolojik çalışmalar; obezitenin aşırı yeme ve azalmış fiziksel aktivite gibi çevresel faktörler ile genetik faktörlerin etkileşimi sonucunda meydana geldiğini göstermiştir (6, 7).

Evrimsel süreç boyunca insanlar açlık, kıtlık, soğuk hava şartları gibi durumlarda, hayatsal faaliyetlerini devam ettirebilmek için bir takım mekanizmalar geliştirmişlerdir. Vücuda alınan enerjinin bir kısmı gelişebilecek tehlikeli durumlarda canlılığını devam ettirebilmek için yağ olarak depo edilmektedir. Son yüzyılda gelişen teknoloji ile birlikte insanların enerji harcamasını kısıtlayan makineler (ulaşım araçları, çamaşır makinesi, tarım araçları) gelişmiş ayrıca buna paralel olarak yüksek kalorili besinler çoğalmıştır. Fakat evrimsel süreçte gelişen yağ depo etme mekanizması ise devam etmektedir (2).

Beden kitle indeksi (BKİ), obezitenin sınıflandırılmasında kullanılan uygulanışı kolay bir yöntemdir (Çizelge 2.1.). BKİ: Ağırlık(kg) / Boy(m^2) formülü ile hesaplanır. BKİ yağ miktarının genel bir göstergesi olup yağ dağılımı hakkında bilgi vermez. Bu nedenle büyüme çağındaki çocuklarda, hamilelerde, sporcularda, ödemle seyreden hastalığı olanlarda BKİ kullanılmamalıdır (2, 8, 9).

Mortalite; belirli bir bölgede, belirli bir nüfus ve zaman süreciyle ilişkili olarak ölüm yüzdesini gösteren istatistiksel bir terimdir. BKİ arttığı zaman mortalite oranı eğrisel bir yükseliş göstermektedir. Bu aşırı mortalite oranı, BKİ 30 kg/m^2 üzeri olduğu zaman daha hızlı bir yükseliş gösterir. Ani ölüm riski ile BKİ 40 $kg/m^{2'}$nin üzeri olduğu obezite arasında ilişki bulunmuştur. Obezite ile ilişkili mortalitenin başlıca sebepleri; hipertansiyon, kalp krizi ve diğer kardiyovasküler rahatsızlıklar, tip 2 diyabet, çeşitli kanserler, safra kesesi rahatsızlıkları ve ani ölümlerdir (1).

Seks steroidleri, cinsiyetler arasında yağ dağılımının farklılık göstermesine neden olur. Testosteron ile visseral yağ kitlesi arasında ters orantılı bir ilişki vardır. Yaşlanma ile birlikte testosteron seviyesinin azalmasına bağlı olarak visseral yağ kitlesinde artış meydana gelmektedir. Testosteronun obezite ile ters yönlü ilişkisi vardır (2).

Çizelge 2.1. Beden kitle indeksine göre obezitenin sınıflandırılması (2, 8)

SINIFLANDIRMA	**BKİ (kg/m^2)**
Düşük kilo	<18.5
Normal kilo	18.5- 24
Aşırı kilo	>25
Obez sınıf I	30.0- 34.9
Obez sınıf II	35.0- 39.9
Obez sınıf III	>40

Bölgesel yağ dağılımı cinsiyete bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yağ depolanması ya iç organların yağlanmasıyla seyreden karın bölgesi yağlanması veya vücudun diğer kol bacak, kalça gibi bölgelerinde olan periferik yağlanma şeklinde olmaktadır. Periferik yağ depolanması menopoz öncesi bayanlarda daha çok uyluk içi, göğüs, kalça gibi bölgelerde olur. Erkeklerde ise karın bölgesinde yağ depo etme eğilimi mevcuttur. Genellikle erkeklerde, menopoz öncesi bayanlara göre daha fazla visseral yağ kitlesi tespit edilmiştir (2).

Seks steroidlerinin vücutta meydana gelen bölgesel yağlanmada rol oynaması nedeniyle yağlanma tipi, ikincil cinsiyet özelliği olarak kabul edilir. Hayatın farklı

dönemlerindeki seks steroidlerinin seviyesindeki değişim ile bölgesel yağ dağılımı paralellik göstermektedir. Ergenliğe kadar kız ve erkeklerde vücut yağ miktarında ve bölgesel dağılımında çok fazla farklılık bulunmamaktadır. Ergenlikten itibaren farklılıklar belirgin hale gelmektedir. Ovaryum tarafından üretilen östrojen ve progesteron, göğüs ve gluteo-femoral bölgelerde total yağ artışına neden olmaktadır (2).

Pubertal seks steroitlerinin etkisiyle, erkeklerde abdominal ve visseral yağ depo edilmesi, bayanlarda ise gluteo-femoral bölgede yağ birikmesi cinsiyete spesifik yağ dağılımına kanıt olmaktadır (2).

Vücuttaki yağ birikimine göre iki tip obezite tanımlanmıştır:

1-Jinoid tip obezite

Gluteal ve femur üzerinde yağ toplanmasına jinoid tip, kadın tipi, periferik tip, armut tipi veya femoral obezite denilmektedir. Bu obezite tipi hiperplastik yani yağ hücre sayısı artışı ile birlikte olan obezitedir. Jinoid obezite ile venöz dolaşım bozuklukları arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ancak obeziteden kaynaklanan diğer komplikasyonlar ile arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır (3).

2-Android tip obezite

Her iki cinste de batın bölgesinde yağ toplanması (göbeklenme), android tip, erkek tipi, santral, abdominal, sentripedal, elma tipi veya visseral obezite olarak adlandırılmaktadır (10). İnsülin direnci ya da metabolik rahatsızlıklar daha çok visseral yağlanma (iç organların etrafındaki yağlanma) ile ilişkilendirilmiştir. Bu metabolik rahatsızlıklar; tip 2 diyabet, polikistik over, hipertansiyondur. Visseral yağlanma ile obezitenin komplikasyonları arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur Bel çevresi ölçümü abdominal obezite, BKİ ise total vücut yağı hakkında bilgi vermektedir (1,3).

Vücutta biriken yağ hücrelerinin sayısı ve büyüklüğüne göre obezite 2 grupta incelenmektedir:

1-Hiperplastik (hiperselüler) tip obezite:

Hiperplastik tip obezite, çoğunlukla çocukluk döneminde, nadir olarak da erişkin dönemde görülür. Yağ hücrelerinin sayısında bir artış olmaktadır.

2- Hipertrofik tip obezite:

Hipertrofik tip obezite, erişkin dönemde görülen ve ayrıca gebelikte de oluşan obezite tipidir. Yağ hücre sayısı normaldir ama yağ hücrelerinin büyüklüğü ve yağ içeriği artmıştır (10).

Yaşlanma ile erkeklerde testosteron düzeyinin azalması ve seks hormonu bağlayan globulin düzeyinin artmasıyla hipogonadizm meydana gelmektedir.

Hipogonadizmin ilk evresindeki yetişkin erkek bireylerde görülen visseral yağlanma aynı miktarda ögonadal erkek bireylerde de gözlenmiştir. Prospektif çalışmalar düşük endojen androjenlerin erkeklerde santral obeziteye neden olduğunu göstermiştir. Androjen visseral olarak yağ birikmesine neden olurken, visseral olarak yağ birikmesi meydana geldikten sonra androjen uyarımı olmadan da visseral birikim devam etmektedir. Hipogonadizm başlangıcında olan yetişkin erkeklerde kemik ve kas kütlesi ögonadal kontrollere göre daha düşük bulunmuştur. Lutein hormon çıkarma hormonu (LHRH) agonistinin etkisiyle sağlıklı erkeklerde androjen eksikliğinin olması yağ kütlesi artışına neden olmaktadır. Prostat kanserinde androjen yoksunluğu tedavisi; yağ kütlesini arttırır, insülin duyarlılığını azaltır ve kardiyovasküler riski arttıran lipit profileri oluşturur ya da tip 2 diyabet olan erkeklerde metabolik kontrolün oldukça kötüleşmesine neden olur. Çok sayıda deneği içeren korelasyon çalışmaları, visseral yağlanmanın yaşla doğru orantılı olarak arttığını göstermiştir (2).

Ayrıca visseral yağ miktarı ile plasma insülin, testosteron, seks hormonu bağlayıcı globülin (SHGB) seviyesi arasında ters orantılı ilişki vardır. Prospektif çalışmalar düşük testosteron düzeyi ile kan basıncı, vücut kitle indeksi, trigliserit, açlık plazma glukozu ile ters orantılı ilişki, HDL-Kolesterol (yüksek dansiteli lipoprotein) ile doğru orantılı bir ilişkinin olduğunu doğrulamaktadır. Yüksek plazma kortizol, düşük testosteron ile tip 2 diyabet ve tekrarlayan kardiyovasküler rahatsızlıklarla prospektif ilişkisi bulunmuştur (2).

Prostat kanserli bireylerde androjen yoksunluğunun metabolik sendrom öğelerinin kötüleşmesine neden olduğu belirlenmiştir. Yaşlı hipogonadal erkeklerde normalleştirilmiş plazma testosteron seviyesi ile visseral yağ birikimini azaltıldığı görülmüştür (2).

2.2. Besin Alımının Düzenlenmesi

Yeme davranışını regüle ettiğini bildiğimiz moleküller; glukoz, yağ asitleri, beyin ve bağırsak peptidleri ile merkezi sinir sisteminden salgılanan düzinelerce nöropeptidlerdir (Şekil 2.1.) (4).

Glukoz glikostatik merkezdir. İnsanlarda ve hayvanlarda glukoz seviyesindeki inip çıkmalar beslenmeyi başlatabilmektedir. Glukozun periferik infüzyonu besin alımını azaltmaktadır. Vagus siniri, beyin ile glikoreseptörler arasında iletişimi sağlamaktadır (4).

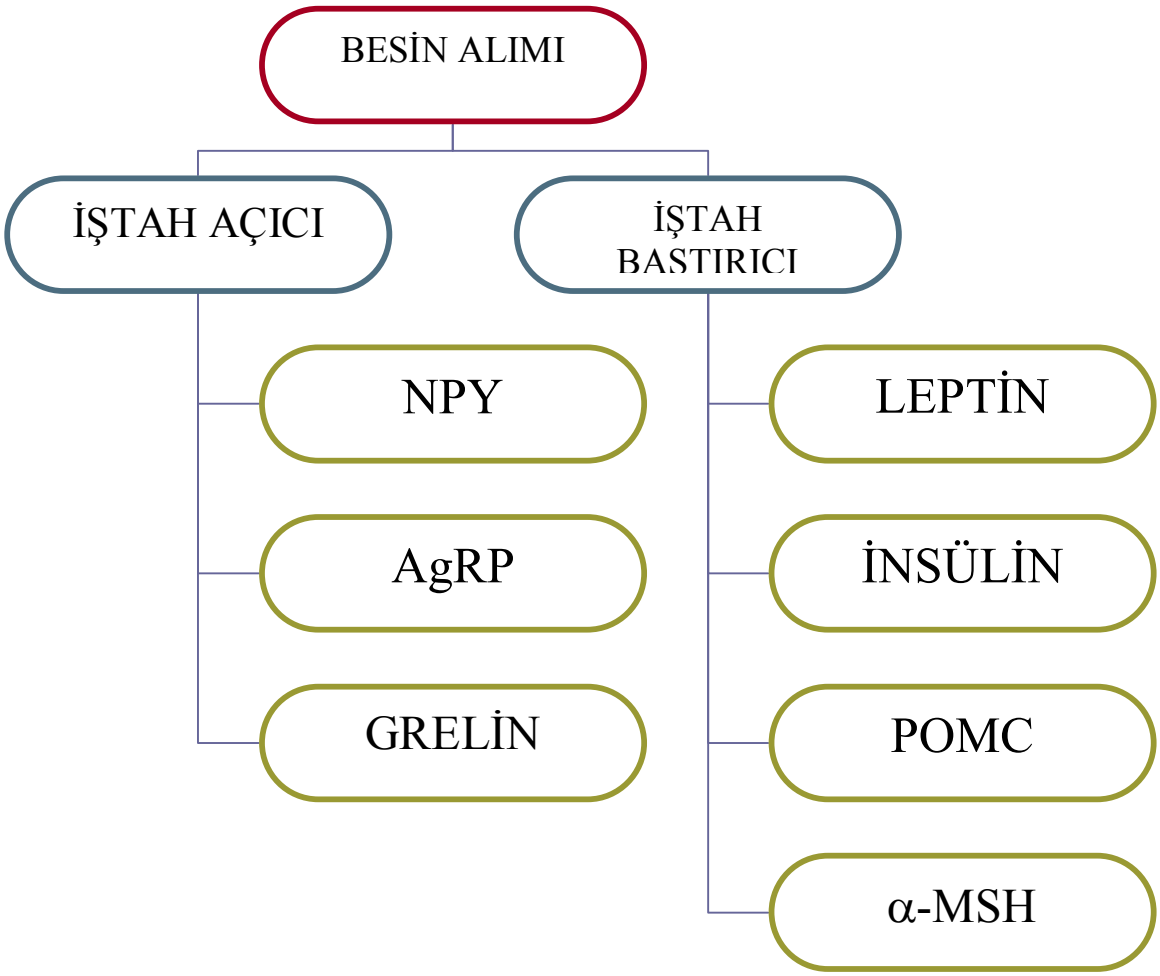
Serumda bulunan ketonlar, yağ asitleri, lipoproteinler beslenmeyi regüle etmektedirler. Yağ asit oksidasyonunun önemli bir metabolik ürünü olan 3-hidroksibütirik asidin intraperitonal seviyesi besin alımını azaltmaktadır. 3-hidroksibütirik asit tarafından meydana getirilen beslenme inhibisyonuna vagus siniri aracılık etmektedir (4).

Besin alınımında insülinin etkileri doz ve etkinliğine bağlıdır. İnsülinin neden olduğu hipoglisemi besin alımını arttırmaktadır. Ventriküler sistemdeki insülinin infüzyonu veya insülinin düşük dozlarının kronik sistemik infüzyonu hayvanlarda besin alımını azaltır, bunun nedeninin insülin beyne ulaştığı andan itibaren, yemek yeme isteğini azalttığı öne sürülmektedir (4).

Leptin seviyesi, şişmanlıkla bağlantılı olarak kalorik kısıtlamayla azalır ve tekrar beslenmeyle artar. Adipositler tarafından salgılanır ve arkuat nukleusun nöronları üzerine etki eder. Leptinin anoreksijenik (iştahı baskılayıcı etki) etkisi Pro-opiomelanokortin (POMC) nöronlarının aktif hale gelmesine aracılık eder. Böylece beslenmeyi inhibe edici bir peptit olan α melanosit stimüle edici hormon (α-MSH) seviyesi artar (4).

Leptin, nöropeptid Y (NPY) ve agouti gen ilgili peptid (agouti-releated protein: AgRP) hormonlarını eş zamanlı olarak bastırarak beslenmeyi azaltıcı etkide bulunur. Leptinin beslenmeyi inhibe edici etkisine ek olarak, sempatik sinir sisteminin termojenik (vücuttun dışarıdan aldığı enerjinin bir kısmını ısı enerjisine çevirme) bileşenlerinin aktivasyonunu artırarak enerji harcanmasını da arttırmaktadır. Leptindeki mutasyonlar leptin yetersizliğini meydana getirebilir buna bağlı olarak hiperfaji ortaya çıkabilir. Birçok genetik çalışma, obez bireylerde yüksek leptin seviyesi ile total vücut

yağları arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Bu nedenle obezitede, leptine karşı hedef nöronlarda göreceli bir direnç olması nedeniyle arkuat nükleusundaki sinyal iletimi değişmektedir (4).



Şekil 2.1. Besin alımının düzenlenmesinde rol oynayan moleküller.

Grelin, orosijenik (iştah açıcı) özelliktedir. Grelin seviyesinde açlık durumundan besin alımına kadar sürekli bir artış gözlenirken, besin alımıyla beraber grelin seviyesinde hızlı bir düşüş görülmektedir. Kemirgenlerde grelin besin alımını ve periferik ya da santral kilo alımını stimüle etmektedir. Grelinin orojenik etkisinin NPY kadar güçlü olduğu görülmüştür. Grelin besin alımını arkuat nukleusundaki nöronların NPY ve AgRP ekspresyonlarını arttırarak stimüle etmektedir (4).

NPY kahverengi yağ dokuda termojenezi azaltır ve bireyin pozitif enerji dengesini yükseltir. Besin alımını ve kilo alımını stimüle eder. Diğer fizyolojik

aktiviteleri ise kan basıncını düzenlemesi, günlük ritim ve belleğe işleme gibi özellikleri vardır (4).

Melanin yoğunlaştırma hormonu (MCH) beyin, deri, pankreas, bağırsaklarda nörotransmitter olarak görev yapmaktadır. MCH nöronları lateral hipatalmusda ve zona intertada bulunmaktadır. Oreksin hormunuyla hiperfajiyi provoke eder ve beslenmenin devam etmesinde rol oynamaktadır (4).

2.3. Obezitenin Etiyolojisi ve Etkileyen Faktörler

Obezite, multifaktöryel bir hastalık olup, genetik, psikolojik, fiziksel, çevresel, sosyoekonomik faktörlerin birbiri ile etkileşimi sonucu meydana gelmektedir (9). Yağ kütlesi birikiminden sorumlu moleküller ve mekanizmalar üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Obezite çok sayıda farklı gen ve farklı moleküler mekanizmalarla meydana gelmektedir. Farklı biyolojik duyarlılıkları olan bireyler üzerinde çevresel, sosyoekonomik faktörlerin etkileri çeşitlilik göstermektedir. Bazı araştırmalar ağırlıktaki farklılıklarda genetik faktörlerin etkisinin %30-80 oranında olabileceğini göstermiştir (6, 11).

2.3.1. Nöroendokrin Obezite

Cushing sendromu, hipotirodizm, insulinoma, polikistik over, hipogonadizm, aşırı yeme epitozu (binge eating) obezitiye neden olmaktadır. Obezite çok nadiren beyinde hipotalamusun ventromediyal kısmında meydana gelen bir hasardan sonra meydana gelebilmektedir. Enerji dengesi özellikle beynin hipotalamusu, adipoz ve yeme organları arasındaki homeostatik mekanizmaları içeren sinyallerle düzenlenir. Hipotalamusdaki lezyonlar sonucu obezite ve hiperfaji meydana gelebilmektedir. Deney hayvanlarında mediyal hipotalamus lezyonları tokluk oluştururken, yanal hipotalamus lezyonları ise tam tersi bir şekilde ağırlık kaybı uyarımı ile beslenmeyi başlatır ve hiperfaji meydana gelir (8).

Cushing sendromu yaygın gözlenen obezite nedenlerindendir (1). Ağırlık, enerji alımı ve enerji tüketimi arasındaki ilişkinin sonucudur. Enerji tüketimi, fiziksel aktivite ve özellikle istirahat sırasında harcanan enerji ile belirlenir (12). Tiroid hormonu tarafından düzenlenen birçok hücresel süreç istirahat sırasında harcanan enerji ile ilgilidir (13). İnsanlarda bu etkinin temelini oluşturan mekanizmalar, daha tam olarak

aydınlatılmamıştır (14). Potansiyel bazal metabolizma hızı ile ilgili metabolik yolun tiroid hormonu tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (12). Hipotiroidizm gibi hormonal rahatsızlıklar da artmış yağ birikimine neden olmaktadır. Bunun sebebinin bazal metabolizma hızının düşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (2).

2.3.2. İlaç Kullanımının Neden Olduğu Obezite

Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların bazı sınıfları yan etki olarak kilo artışına neden olmaktadır. Örneğin; antihistaminler, antidiyabetikler, antihipertansif ajanlar, HIV proteinaz inhibitörleri, steroid hormonlar ve nörolojik ilaçlar (3, 15).

Diyabet tedavisinde kullanılan sülfonilüreler ve tiazolidinedion kilo alımına neden olmaktadır. Tedavi amaçlı kullanılan bazı antidepresanlar, antiepileptikler, nöroleptikler ve siproheptadin de vücut ağırlığının artmasına neden olabilmektedir. Muhtemelen merkezi sinir sistemindeki monoaminleri etkileyerek obeziteye yol açmaktadırlar (1).

2.3.3. Diyete Bağlı Obezite

İnfant dönemde yeme bozuklukları, progressif hiperfajik obezite, sık yemek yeme, yüksek yağlı yemeklerin yenmesi obeziteye neden olmaktadır. Tatlandırıcı kullanılmış hazır içeceklerin tüketilmesi, bol, çeşitli ve ucuz yiyeceklerin bulunduğu kafeteryalar ve süpermarketler obezitenin gelişimindeki beslenme ile ilgili faktörlerdir. Beslenme kültürünün değişmesi fast food tarzı yüksek kalorili besinlerin tüketilmesi ve fiziksel hareketliliğin azalması da obezite de önemli payı olan etmenlerdir. Büyük porsiyonlarda besin tüketimi, besin tüketimini arttırır. ‘‘Az yemek’’ stratejisi basit bir davranış değişikliği gibi görünse de bu davranış stratejisini deneyen programlar çok az etki yapmıştır (1).

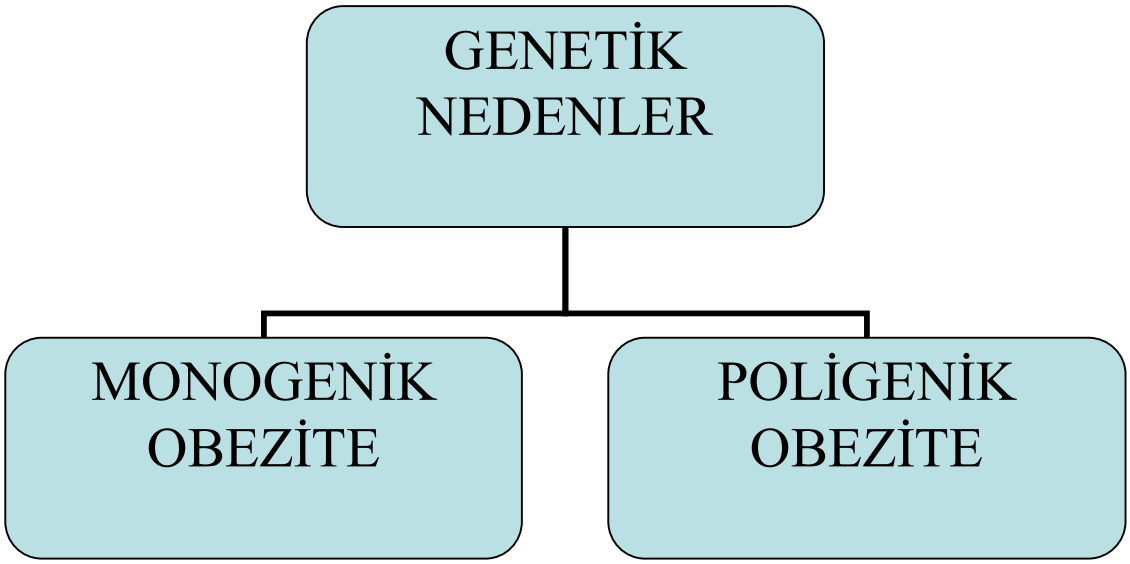
2.3.4. Azalmış Enerji Harcaması

Modern toplumlardaki bireylerin beslenme ile aldıkları enerji ile harcadıkları enerji arasındaki dengesizlik obezitenin önemli sebeplerin birisidir. Total enerji harcaması, istirahat sırasında harcanan enerji ve değişken miktardaki fiziksel aktive sırasında harcanan enerjilerden oluşur (1, 16). İstirahat sırasında harcanan enerjinin; %70’ini bazal metabolizma, %10’nu besinlerin termik enerjisi ve % 20’sini spontan

fiziksel aktiviteler oluşturmaktadır. Yalnızca % 2'lik bir oran kadar günlük enerji alımı ve çıkışı arasındaki tutarsızlık olması kilo alımını teşvik edici rol oynamaktadır. Ayrıca her ne kadar metabolizma hızı bireyin vücut ağırlığı ile ilgili ise de bireyler arasında %20'lik önemli farklar görülmektedir (16).

İstirahat sırasındaki enerji harcanması; kadınlar erkeklere göre daha az enerji harcarlar ve yaşla beraber istirahat sırasında harcanan enerjide gerileme gözlenir. Yaşla beraber bu gerilemeye benzer şekilde besin alımında bir azalma olmazsa, yağ birikiminin artmasına neden olmaktadır (1).

Fiziksel aktivite değişken olmakla beraber ortalama olarak günlük enerji alımının üçte birinin harcanmasından sorumludur. Enerji harcaması en kolay kontrol edilebilen bir öğe olduğu için obezite tedavilerinde de kullanılmaktadır. Besinlerin termik enerjisi; besinlerin yenmesini takiben besinlerin termik enerjisi nedeniyle enerji harcanması olur. Besin yenmesi ile alınan kalorinin %10' u besin yenmesi ile meydana gelen ısı için kullanır. Proteinler en büyük etkiye sahip olanlardır. Vücutta yiyeceklerin termik etkisi, metabolik verimsiz enerji tipidir. Çünkü vücutta meydana gelen bu ısıdan faydalanılamaz. Besinlerin termik etkileri, özellikle bozulmuş glikoz toleransı olan ya da diyabeti olan obez bireylerde azalmıştır. Akut olarak aşırı ya da az beslenme tüm metabolizmada %15-20 oranında kaymalara neden olmaktadır. Enerji harcamasının ve fiziksel aktivitelerin artırılması obeziteden korunmada önemli yollardan birisidir (1).



Şekil 2.2. Obezite'ye neden olan genetik nedenler.

2.3.5. Genetik Nedenler

İkiz çalışmaları, vücut kütlesinin değişiminde genlerin yüksek oranda etkili olduğunu göstermiştir. ''Tutumlu genler'' hipotezine göre kalıtsal adaptasyonlar, gıda fazlalığının etkili depolanmasını sağlar böylece sık gıda sıkıntısı ve kıtlık zamanlarında hayatta kalmak için avantaj sağlanmış olur. Gıdaların sürekli ve gereksiz olarak bulunduğu zamanlarda tutumlu genler obezite, tip 2 diyabet ve hipertansiyona neden olurlar. Pima Hintlilerinde olduğu gibi, yüzyıl önce beslenme yönünden sınırlı olan güneybatı Arizona çölünde yaşarken Pima Hintlilerinde obezite çok nadir görülmüştür. Günümüzde ise %75' den fazlası obez, % 45'i ise tip 2 diyabet hastasıdır. Genler enerji alımında rol oynadıkları gibi harcanmasında da rol oynarlar. Bazı araştırmalar, genetik faktörlerin ağırlıktaki farklılıklarda % 30-80 oranında etkilerinin olabileceğini göstermiştir (8).

Kilo regülasyonunda 400'den fazla genin etkili olduğu bulunmuştur. Kalıtımın pozitif enerji dengesini nasıl etkilediği günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır. Obezitiye genetik faktörlerin katkısı aşağıdaki gibi özetlenebilir (Şekil 2.2.) :

Monogenik Obezite: Tek mutasyon ile obezitenin meydana gelmesidir. Monojenik obezite genellikle nadir gözlenen çocukluk çağında başlayan obezite çeşididir. Örneğin; Simpson dismorfisi, Alström (6, 8, 11).

Poligenik Obezite: Çeşitli genetik varyantlar ile çevrenin etkileşimi sonucu meydana gelen obezite formudur. Polijenik obezitede rol alan genler tek tek incelendiğinde bireylerin ağırlıklarında çok az etkili oldukları tesbit edilmiştir. Bu genlerin kümülatif katkısı önemli iken aşırı yemek yeme, azalmış fiziksel aktivite, hormonlardaki değişimler, sosyoekonomik faktörler gibi çevresel faktörlerin hepsi genlerin fenotipik ifadesini etkilerler (6, 8, 11).

Bir başka görüşe göre ‘‘Yaygın Hastalık-Yaygın DNA Değişiklikleri hipotezi’’ önerilmiştir. Bu hipoteze göre obezite genetik risk hastalığı meydana getiren ortak alleller nedeniyle olmaktadır. Sonuç olarak yaygın allellerin neden olduğu obezitenin yüzdesi yüksektir. Bu hipotez multifaktöriyel hastalıklarda geçerlidir. Ancak bu hipotezin güçlü savunucuları kabul etmiş olsalar bile, bazı durumlarda nadir varyant alleller obeziteye etki etmektedir. Ortak obezite için risk çok sayıda lokusa ve her lokusa ait düşük frekaslı allellere bağlı olabilir. Günümüzde hem poligenik kalıtım hemde monogenik kalıtım obezite için geçerlidir. Çünkü ikisinden birini daha fazla teyit edecek moleküler yaklaşım yoktur (6, 8, 11).

2.3.5.1. Monogenik Obezite

Mendeliyen Obezite

Obezite, 20-30 kadar Mendeliyen hastalıklarla ilişkilidir (Çizelge 2.2.). Hastaların klinik tablolarında obezitenin yanısıra mental retardasyon, dismorfik özellikler spesifik organlarda anormal gelişim gibi ayırt edici özellikleri bulunmaktadır. Başlangıçta monogenik hastalıklar olarak düşünülen bu sendromların belirlenmesinde, moleküler araştırmalar farklı genlerin katkısı olduğu fikrine daha çok götürmektedir (6, 8, 11).

Bu konudaki ilerlemeler, etkilenmiş ailelerin tüm genom taramasının yapılması ile elde edilen sonuçların gözlemlenmesinden öğrenilmektedir. Örneğin, Bardet-Biedl (BBS), Prader –Willi (PWS) ve Alström sendromlarından sorumlu genler belirlenmiştir.

BBS genelde her 100.000 doğumda 1 iken Arap ve Bedevi populasyonlarında artan bir yaygınlıkla 13.500 doğumda bir gözlenmektedir. BBS, erken dönemde başlayan obezite, çubuk- koni distrofi, polidaktili, mental retardasyon, renal hastalıklar şeklinde karakterize edilmiştir (6).

Çizelge 2.2. Obezite ile ilgili genetik sendromlar (11)

Prader-Willi
Barder-Biedl
Laurence-Moon
Biemond sendromu II
Alström
Schinzel
Stein-Leventhal
Cohen
Albright herediter osteodistrofi
Borjeson
Saf Sertoli hücreli germinal hücre aplazisi sendromu
Jinekomasti ve obesite ile seyreden mental retardasyon,
Simpson dismorfisi
Trizomi 21
Carpenter

Başlangıçta tek kromozomdaki mutasyondan kaynaklandığı düşünülmüş ancak yapılan çalışmalar sonucunda BBS'nin en az 11 farklı kromozomda meydana gelen mutasyonlar sonucu olduğu tespit edilmiştir.

BBS nin kromozomlar üzerindeki lokalizasyonu şu şekildedir; BBS1 11q13, BBS2 16q21, BBS3 3p13, BBS4 15q22.3,BBS5 2q31,BBS6 20p12, BBS7 4q27, BBS8 14q32.11, BBS9 7p14, BBS10 12q21.2, BBS11 9q33.1 (6, 11).

McKusick Kaufman sendromuna (MKKS) neden olan MKKS geni, şaperon proteini kodlayan BBS6' dır. BBS vakalarının % 5-7' sinde MKKS genindeki mutasyona bağlı olarak normalden kısa bir şaperon proteininin üretildiği belirlenmiştir.

BBS1, BBS2, BBS4 loküsünde bulunan genler BBS1, BBS6' dan farklı olarak MKKS genine substrat kodlamaktadırlar. BBS'nin otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalık olduğu belirlenmiştir.

Paternal 13 nolu kromozomda mutasyon PWS obezite, hiperfaji, hipotoni, dismorfizm, sterilite, büyüme hormonu salınım yetersizliği, kognotif azalma gibi fenotipik özelliklere sahip genetik bir hastalıktır (11).

Bir ve 6 yaş arasındaki hastalar hiperfajik ve hipotalamik disfonksiyona bağlı olarak doyurulamayan açlık hissi nedeniyle yiyecek arama davranışları içerisindedirler. Bu davranış ve düşük metabolik hız obeziteye yol açar. Kardiyopulmoner hastalık ve tip 2 diyabet içeren morbiditenin ana sebebi obezitedir. Eğer obezite önlenebilirse hayat süresi neredeyse normale yakın olabilir (17).

PWS'li bireylerde obezite fenotipine yol açan aday bir molekül bulunmaktadır. Bu molekül gastrik bir enzim olan grelindir. Beslenmeyi stimüle eder ve büyüme hormonu salgılatır. Açlık halinde kanda yüksek miktarlarda bulunmakta olup, yemek yeme ile miktarı azalmaktadır. Grelin düzeyleri obez bireylerde düşük iken, PWS ve anoreksiyalı hastalarda yüksek bulunmuştur (6). Ayrıca, büyüme hormonu salgılatıcı reseptörün yapısal olarak aktivasyonu, genin bu reseptör açısından polimorfizm göstermesi ve yemek sonrası grelin baskılanmasının düzenlenmesindeki bozukluk, obez fenotipe katkıda bulunmaktadır.

Alström çok nadir gözlenen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Obezite, sensorinöral sağırlık, akantozis nigrikans ve retinal dejenerasyon bu sendromun klinik belirtileridir. Bu belirtilerle birlikte; hipogonadizm, kısa boy, glomerulotübüler displazi, benign kardiyomiyopati, hiperlipidemi, mental retardasyon ve hepatik disfonksiyonun görüldüğü olgular literatürde bildirilmiştir (11).

Diğer Genlerle İlişkili Obezite

Obezite'nin en az 200 hastada tek gen mutasyonu ile ilişkisi bulunmuştur (Çizelge 2.3.). Bağlantı çalışmaları, model hayvan ve spontan insan mutasyonlarına ek olarak farmakolojik çalışmalar göstermiştir ki monogenik obezitenin ana nedenleri leptin ve melanokortin yollarının enerji homeotazisi üzerine etkileridir (6).

POMC geni beyin, bağırsak ve pankreasta sentezlenmektedir. POMC proteini, merkezi sinir sisteminde meydana gelen bir homeostatik yanıtla çevreden leptin sinyalinin aktarmasına katılır. Merkezi sinir sisteminde POMC'in üretimi, leptin tarafından uyarılır ve proteinin translasyon süreci sonrasında farklı fonksiyonlar içeren farklı peptidlerin oluşumuna olanak tanır. POMC'in post translasyon sürecini etkileyen

faktör, beyinde belirli lokalizasyonu bulunan endoproteolitik enzimin türü olduğu bulunmuştur (6, 11).

Hipofizin anteriorunda Prohormon konvertaz1 (PC1) enziminin varlığı ACTH (Adrenokortikotropin) lipotropin peptidi üretimine izin verirken hipotalamusda PC1 ve PC2 varlığı ise alfa, beta, gama-MSH (Melanosit stimüle edici hormon) ve beta endorfinlerin üretimini belirlemektedir (6, 11).

Leptin ve leptin reseptörü, POMC, melanokortin- 4 reseptör (MC4R) ve PC1 kodlayan genlerdir. Bu beş gen tarafından kodlanan bütün proteinler, aynı besin alım regülasyon yolunda bulunmaktadırlar. Leptin, leptin reseptörü (LEPR), POMC, PC1 genlerindeki nadir mutasyonlar obeziteye neden olmaktadır. Bu hastalıkların kalıtımı otozomal resesiftir. Leptin, LEPR, POMC, PC 1 genlerinde mutasyonu meydana gelen bireylerin ağırlık eğrileri dikkate değer bulunmuştur. Bu mutasyonların sonucunda erken dönemde başlayan obezite ve anormal endokrin bulgular gözlenmiştir (6, 11).

Leptin ve LEPR geni mutasyonu taşıyan bireylerde ergenlikleri boyunca hipogonotropin, hipogonadizm, tirotropin yetersizliği görülmektedir. Somatotropin sekresyon yetersizliği, leptin reseptöründe mutasyon meydana gelen bireylerde görülmektedir. T hücre sayısı ve fonksiyon yetersizliği ile yüksek oranda enfeksiyonla ilişkili olduğu bulunmuştur (11).

Bazı bireylerde spontan olarak ergenlik döneminde oluşan leptin yetmezliği, leptin ya da leptin reseptör geninde meydana gelen mutasyona bağlı olduğunun kanıtıdır (6, 11).

POMC yetersizliği olan obez çocuklarda, ACTH yetersizliği de olmaktadır. Buna bağlı olarak doğumdan itibaren akut adrenalin yetmezliği görülmektedir. Hollanda, İsviçre, Slovenya ve Almanya'da POMC mutasyonu taşıyan 5 hasta tespit edilmiştir. Leptin eksikliği görülen çocuklar ve yetişkinlere yapılan leptin enjeksiyonundan sonra büyük oranda besin alımının azalmasına ek olarak immüniteyi de içeren birçok fonksiyon bozuklukların düzelmesinde fayda görmüşlerdir (6, 11).

Kromozomlarda meydana gelen de novo translokasyonlar ve mutasyonlar besin alımını düzenleyen genleri etkileyerek obezitenin gelişmesine neden olabilirler. Obezite teşhisi konmuş altı aylık hasta bebekte 1p22.1 ve 6q16.2 kromozomları arasında de novo dengeli translokasyon belirlenmiştir. Leptin ya da leptin reseptöründe yetersizlik olduğu görülmüştür. Bu translokasyon sonucunda altıncı kromozomda bulunan SIM 1

Çizelge 2.3. Monogenik obezite de rol alan genler (11).

GENLER	KALITIM ŞEKLİ	OBEZİTE	İLİŞKİLİ FENOTİP
LEPTİN	**Resesif**	**Doğumdan itibaren**	**Gonotropin ve tirotropin yetersizliği**
LEPTİN RESEPTÖR	**Resesif**	**Doğumdan itibaren**	**Gonotropin, tirotropin, somatotropin yetersizliği**
POMC	**Resesif**	**Doğumdan sonraki ilk aydan itibaren**	**ACTH yetersizliği, hafif hipotiroidi, kızılımsı sarı saç**
PC1	**Resesif**	**Doğumdan sonraki ilk aydan itibaren**	**Gonotropin ve kortikotropin yetersizliği, hiperproinsülinemi ve diğer bağırsak peptidlerinde fonksiyon bozukluğu**
MC4R	**Dominant**	**Erken dönem**	**Çeşitli fenotipler**

geni etkilenmiştir. Farelerde bu gen hipotalamusun paraventriküler nükleusunun gelişiminden sorumludur (6, 11).

Erken dönemde başlayan obezite, mental retardasyon, gelişme geriliği, öğrenme, erken hafıza gibi daha yüksek nörolojik fonksiyonların gelişiminde geçikme ve anormallikler şeklinde semptomları olan sekiz yaşındaki çocukta, NTRK2 geninde de novo heterezigot mutasyon belirlenmiştir. Merkezi sinir sisteminden salgılanan ve besin alımını düzenleyen beyin kökenli nörotropik faktörün (BDNF) reseptörünü kodlamaktadır. Bu gendeki mutasyon sonucunda reseptörün otofosforilasyonunu

zorlaştırarak alternatif Map kinaz sinyal yolu oluşumuna neden olur. TrkB geninin çeşitli mutant tiplerinde de erken dönemde gelişen obezite görülmüştür (6, 11).

Melanokortin yolundaki en önemli öğe (MC4R) melanokortin 4 reseptörüdür. MC4R besin alımının en önemli düzenleyicisidir. Farelerde meydana gelen mutasyon sonucunda morbid obezite (BKİ > 40, sınıf III obezite) gözlenmiştir (6, 11).

Amerika, Fransa, Almanya, Danimarka ve İngiltere populasyonlarında yapılan çalışmalar sonucunda MC4R geninde sesli ya da sessiz delesyonlar ve frameshift olmak üzere çeşitli mutasyonlar belirlenmiştir. MC4R mutasyonunun kalıtımı otozomal dominant bir kalıtım gösterirken penetrans tam değildir. Klinik septomları vakalar arasında farklılık göstermektedir (6, 11).

2.3.5.2. Poligenik Obezite

İnsanlarda poligenik obeziteye neden olan genlerin araştırılmasında, genellikle aday gen çalışmaları ve genom taramaları olmak üzere iki yöntem uygulanmaktadır. Aday genler, enerji homeostazisindeki biyolojik etkileri nedeniyle obezitede bir role sahip oldukları düşünülen genlerdir.

Aday genler obezite ile ilgili üç yolla etki gösterirler. Birincisi Santral Sinir Sistemi tarafından besin alımı regülasyonu, ikincisi hedef dokularda glukoz metabolizması ve insülin etkisinin modülasyonudur. Bu etki, obezitenin indüklediği insülin rezistansının gelişimi ve yağ depolanmasının artımına katkıda bulunabilmektedir. Sonuncusu enerji sarfının regülasyonu, lipid oksidasyonunu içeren lipid metabolizması, lipolizis ve daha genel anlamda adipoz doku metabolizmasıdır.

Obezite genlerinin taranmasında önemli bir yöntem genomik taramalardır. Genom boyunca oldukça fazla yer kaplayan polimorfik markerlerle (mikrosatellitler) yapılan bağlantı analizleri, hastalıkla istatistiksel olarak önemli ko-segregasyon gösteren kromozomal bölgeleri tanımlar (11).

2.4. IRS Gen Ailesinin Üyeleri

İnsülin reseptör subsrat proteini (IRS) ailesi, insülin sinyal sisteminde anahtar rol oynayan aracı moleküllerdir. IRS altı üyeden meydana gelmektedir. Bunlar IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, IRS-5, IRS-6. IRS ailesi genlerinin, kromozomlar üzerindeki lokalizasyonları, dokulardaki dağılımları, insülin reseptörlerine bağlanmaları ve

sentezleri birbirinden farklıdır. Bu farklılıklar her birinin fonksiyonun diğerinden farklı olmasına yol açmaktadır.

IRS gen ailesi üyelerinin genel yapısı birbirine benzemektedir. NH_2 terminal bölgelerinde membran fosfolipidlerine bağlanmayı sağlayan (pleckstrin homoloğu) PH domaini, fosfotirozine bağlanma bölgesi PTB domaini bulunmaktadır. IRS proteninin sentezi steroidler, sitokinler, hormonlar ve integrinler gibi birçok fizyolojik yolla düzenlenebilmektedir.

IRS-1, IRS gen ailesinin ilk belirlenen üyesidir. İnsan kromozomlarında 2q36 lokalize olmaktadır. IRS-1'de 21 tane tirozin fosforilasyon alanının bulunduğu sanılmaktadır. Bunlardan birkaçı amino asit sekans motiflerinin arasına lokalize olmaktadırlar ve SH-2 domain proteinleri, PI 3-kinazın regülatör subuniti olan p85, büyüme faktör reseptörüne bağlanma proteini 2 (Grb-2) gibi adaptör proteinlere, Csk (C-Src Tirozin Kinaz) gibi onkoproteinlere, fosfolipaz C gama ve SHP-2 (Src Homoloji-2 İçeren Tirozin Fosfataz-2) gibi proteinlerin bağlanmasını sağlamaktadır. IRS 1, kazein kinaz, protein kinaz C, protein kinaz B gibi çeşitli kinazlar tarafından tanınan potansiyel serin / threonin motif yerleri içermektedir. IRS-1, adipoz ve kas gibi periferik dokularda insülinin metabolik ve mitojenik etkilerine arabuluculuk etmektedirler. Birçok çalışma pankreatik beta hücrelerinden insülin salınmasını regüle edici rol oynadığını göstermiştir (19, 20).

IRS-3 geni kemirgenlerde izole edilmiştir. IRS-1, IRS-2'den 700-800 amino asit kısadır. Benzer protein yapısına sahip ve PH (pleckstrin homoloğu) domaini, PTB domaini ve COOH domaini mevcuttur. Kalp, ovaryum, akciğer ve karaciğerde sentezlenir.

IRS-4 geni insanlarda X kromozomunda lokalize olmuştur. IRS-4 proteini 160 kDA moleküler ağırlığında olup, 1257 amino asitten meydana gelmiş ve diğer IRS ailesinin üyeleri gibi (pleckstrin homoloğu) PH domaini, PTB domaini ve COOH domaini bulunmaktadır. IRS-4 sırasıyla % 27 ve % 29 oranında IRS-1 ve IRS-2 ile yapısal benzerlik gösterir. IRS-4 12 tane tirozin fosforilasyon alanı içerir. Bunlardan 7 tanesi PI3 kinazın subunitesi olan p85'in SH2 domainin bağlanması için YXXM motifine sahiptir. IRS-4 iskelet kasları, beyin, hipotalamus, karaciğer ve böbrekte sentezlenir.

IRS-4'ün fonksiyonları in vitro olarak araştırılmıştır. IRS-4 proteinin kemirgen adipositlerinde aşırı salgılanması ile GLUT4 (Glukoz transport proteini) moleküllerinin sayısında belirgin bir artış olduğu ve bu GLUT4 moleküllerini hücre yüzeyine topladığı görülmüştür.

IRS-1 ve IRS-2 proteinlerinin tersine, IRS-4 proteinin aşırı ifadesi (myeloid hücre serisi) 32D kökenli hücre serisindeki hücrelerin canlı kalamadıkları gözlenmiştir. Bu da gösteriyor ki IRS-4 proteini IRS-1 ve IRS-2 proteinlerine göre farklı sinyal sistemine sahiptir (18). IRS-4 ve IRS-3 genlerinin aşırı ifade edilmesi, IRS-2 ve IRS-1 ile yarışarak PI3 kinazın regülator subünitesi olan p85'e bağlanır ve böylece IRS-2 ve IRS-1 'in p85'e olan ilgisinin azaldığı görülmüştür.

2.5. IRS-2 Geni ve Proteini

IRS-2 geni, 13 numaralı insan kromozomunun q34.1 bandında bulunur. IRS-2 önemli ölçüde yapısal olarak IRS-1'e benzemektedir. Özellikle NH_2 terminal özellikleri % 75 oranında benzerlik göstermektedir. Buna karşın IRS-1'de bulunmayan ve PTB domainine ek olarak IGF-IR (insülin benzeri büyüme faktörü- insülin reseptörü) ve IR (insülin reseptörü) bağlanabilmek için gerekli olan 591 kodon ile 733 kodon arasında yer alan spesifik domain bulunmaktadır. COOH terminali ise zayıf biçimde benzemektedir fakat 20'den fazla ortak tirozin fosforilasyon motifi bulunmaktadır ve IRS-1 ile aynı sinyal moleküllerine bağlanmaktadırlar.

IRS-2 insülin sinyal sisteminde önemli bir moleküldür. IRS-1 ile birlikte karbonhidrat metabolizmasında ve somatik büyümede insülinin etkilerini yönetmektedirler. Farelerde IRS-2'nin bozulması sonucu diyabetin meydana geldiği gösterilmiştir. Bu sonuç büyük ölçüde hepatik insülin direncine ve beta hücrelerinin yetersizliğine bağlanabilmektedir (19).

İnsanlarda IRS-2 geninde 4 tane fonsiyon değişikliğine yol açabileceği tahmin edilen polimorfizm olmak üzere 10 tane polimorfizm belirlenmiştir. Bunların arasından tip 2 diyabet hastalığı için risk meydana getirebilecek kadar yüksek yaygınlığa sahip 1057. kodonda meydana gelen polimorfizm öne çıkmaktadır (19).

IRS-2 geninin 1057. kodonunda glisin amino asidinin (GGC), aspartik asit amino asidine (GAC) dönüşümü ile tek nükleotid polimorfizmi (SNP) meydana

gelmektedir. IRS-2 geninde 1057 kodonda meydana gelen aminoasit değişimi iki önemli fosforilasyon bölgelerinin arasında bulunmaktadır (20).

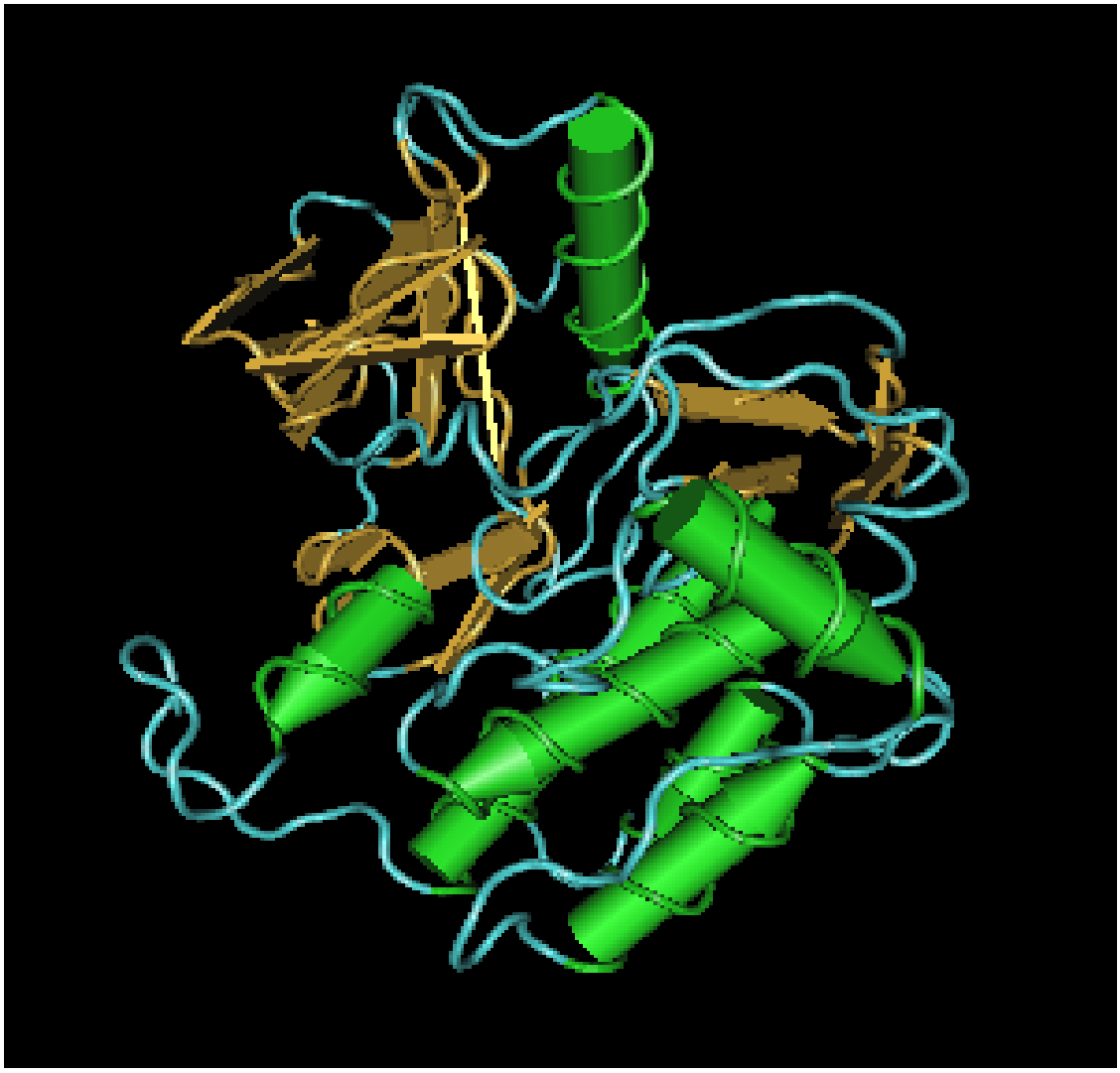
Danimarkalı, İsveçli, Hollandalı, Finli, Kafkasyalı, Alman, Çinli populasyonlarında yapılan çalışmalarda IRS-2 geni ile tip 2 diyabet hastalığı arasında risk bulunmamıştır (20). Polikistik over tanısı konmuş bayanlarda bozulmuş glukoz toleransı ve azalmış insülin hassasiyeti ile IRS-2'nin ilişkisi gösterilmiştir (18, 21).

IRS-1 ve IRS-2 farklı dokularda dağılım göstermeleri, farklı subsellüler alanlarda lokalize olmaları, farklı kinetik aktivasyon ve deaktivasyon göstermeleri, farklı sinyal sisteminin aşağı yönlü (downstream) elemanlarıyla etkileşime girmeleri nedeniyle birbirine benzemeyen metabolik yolları düzenleyebilmektedirler. Örneğin; IRS-1 intrasellüler membran bölümünde lokalize olurken IRS-2 sitozolde lokalize olmaktadır. IRS-2 proteini, IRS 1 proteinine göre PI3 kinazı daha çabuk fosforilleyip aktive eder. Aktivasyon kinetiklerinin farklı olması, IRS-1 ve IRS-2 yoluyla insülin sinyalerinin iletilmesinde çeşitlilik olmasına katkıları olmaktadır.

2.6. IRS-2'nin Vücuttaki Dağılımı

IRS-2 başta beyinde olmak üzere karaciğer, kas, kalp, adipoz, böbrek, ovaryum, meme bezlerinde sentezlenir. IRS-2, beyinin gelişiminde, fertilizasyonda, besin alınımının regülasyonunda önemli rol oynamaktadır (22).

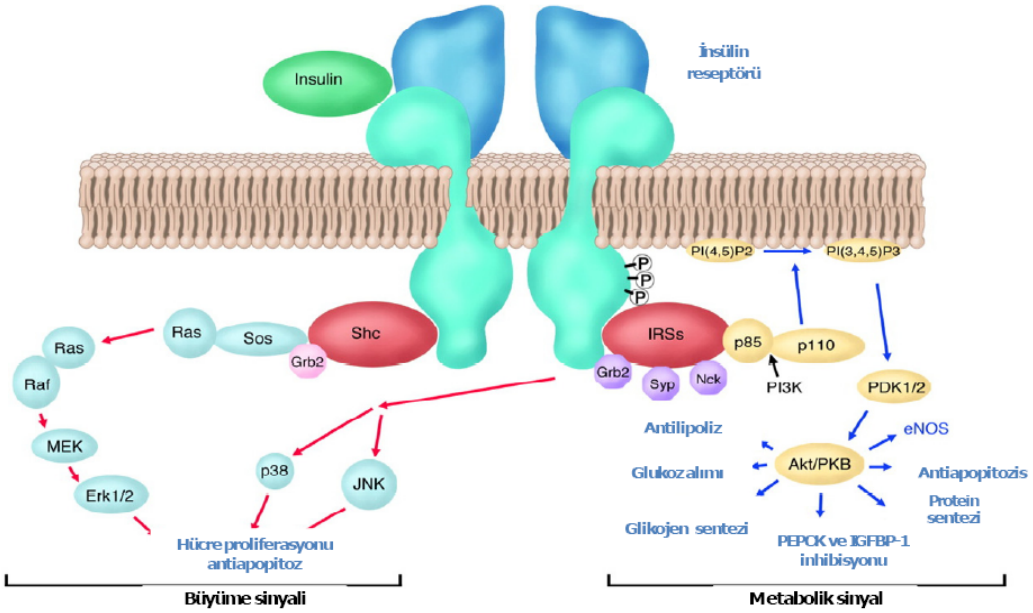
Uygulanan immünohistokimyasal çalışmalarda beyinde IRS-2 için pozitif immünoreaktivite gözlenmiş ve bu çalışmaların sonucunda miktarının en çok arkuat nukleus, ventromedial nükleusda bulunduğu gösterilmiştir. Beyinde bulundukları diğer yerler, ventral tegmental alan, hipoglossal nükleus, paraventriküler nükleus, vagusun dorsal motor nükleustur. Dorsal medial nükleusda ve lateral hipotalamik alanda dağılım göstermezler.



Şekil 2.3. IRS-2 üç boyutlu yapısı (23).

2.7. İnsulin Reseptör Substrat–Fosfatidilinozitol 3-Kinaz'ın (IRS–PI3K) Metabolik Yolu

Kilo alımının kontrolü leptin ve insülin gibi nöral sinyallere bağlıdır. Deney hayvanlarında arkuat nükleus yakınlarına yapılan insülin infüzyonlarının iştahı stimüle edici NPY yapımını inhibe ettiği gösterilmiştir. Deney hayvanlarında insülin reseptörlerinin bloke edilmesi ile hızlı yemek yemesini arttırdığı gözlenmiştir (24,25).



Şekil 2.4. İnsülin sinyal yolları (25).

Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar IRS-2'de hasar meydana geldiğinde hiperfajinin gelişmesi ve buna bağlı olarak da obezitenin meydana geldiğini göstermiştir. . Günümüzde IRS-2 G1057D polimorfizmin insülin üzerindeki etkisi açık değildir. IRS-2 molekülündeki amino asit değişimi iki önemli tirozin fosforilasyon alanında (1042 kodon ile 1072 kodon) bulunmaktadır. Bu değişimin alternatif bir sinyal oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir. Bu alternatif sinyalin, obezitenin gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir (24, 25).

İnsülin, insülin reseptörünün (IR) ekstrasellüler alfa subünitlerine bağlandığı zaman alfa subunitler de birbirlerine disülfit bağı ile bağlanırlar. Böylece IR'nin hücre içinde kalan bölümündeki beta subünitin intraselüler tirozin kinaz bölümünü aktive ederler. Bir reseptörün beta subüniti spesifik tirozin üzerinden diğer beta subüniti fosforiller ve bunun sonucunda IRS'nin intra moleküler etkileşimleri için uyarı sağlanır. IR, IRS' deki tirozin rezidülerine ATP'den aldıkları γ-fosfatı transfer ederler. IRS'ler tirozin fosforilasyonu sonucu aktive olup, PI3K'nın regülatör alt ünitesi olan p85'e bağlanır ve PI3K enziminin katalitik alanını aktif hale getirilir. Bu enzim insülin duyarlı dokularda glikoz transportunu sağlayan glikoz transport proteini-4 (GLUT-4)'ün uyarılması için gerekli olan moleküllerden biridir. GLUT-4'ün uyarılması için gerekli olan diğer moleküller PI-3-kinaz 3,4,5-trifosfat (PIP3). Aktif hale getirilen PI3K, fosfatidil inozitol - 4,5- bifosfatı (PIP2) fosforilleyerek PIP3 dönüştürür. PIP3, bir lipid mediyatördür ve PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur. Bu aktivasyon sonunda hücre içine glikoz alımı için gerekli olan GLUT-4 molekülü uyarılmış olur (11,17, 25, 26).

İnsülinin, IR bağlanması ile başlayan ve IRS-2 proteini ile etkileşmesi ile devam eden PI3K yolağı sonucunda GLUT-4 molekülü uyarılır ve hücre içine glukoz alımı meydana gelir. Bu biyokimyasal süreçlerde etkin rol oynayan IRS-2 geninin 1057. kodonunda meydana gelen amino asit değişimi ile fonksiyon değişimi meydana gelir. Bu değişim IRS–PI3K yolunu etkileyibilir. IRS–PI3K yolunun etkilenmesi sonucu hücre içine glukoz girememesine bağlı olarak hücrelerde glukoz açlığı meydana gelebilir. Hücredeki bu açlık bireyin açlığı şeklinde görülür. Böylece ileri derecede açlık duygusu belirir ve birey bol miktarda yeme ihtiyacı duyar. Sonuçta polifajiye bağlı obezite gelişebilir.

2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyon (Polymerase Chain Reaction-PCR) Tekniği

Polimeraz Zincir Reaksiyonu; spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan bir in vitro yöntemdir. İlk kez 1985 yılında Henry A. Erlich, Kary Mullis ve

Randall K. Saiki tarafından uygulanmıştır. PCR yöntemi, avantajları nedeniyle moleküler biyoloji, tıp, arkeoloji gibi değişik alanlarda uygulanabilen bir yöntemdir. Aynı şekilde bu yöntem, saç teli, sperm gibi değişik dokulardan elde edilen 1-2 hücre gibi çok az sayıdaki hücreden bile sonuç alma imkanı sağlamaktadır. Bunun yanı sıra, parafinlenmiş dokular, gutri kanları ya da hücre lizatları, amplifikasyon için kalıp oluşturmaktadır. 1 mikrogramdan daha az DNA materyalinden 1-2 saat gibi kısa süre içinde sonucun alınıp tanının konabilmesi, PCR yönteminin en avantajlı yönlerinden birisidir (27, 28).

Ayrıca günümüzde PCR tekniği, doku transplantasyonlarında allelik varyasyonlarının gösterilmesi ile doku tipinin belirlenmesi ve adli tıp örneklerinin genetik tiplendirmesi (babalık tayini gibi) gibi alanlarda kullanılmaktadır (27, 28).

PCR'nin Temel Bileşenleri

- Kalıp olarak kullanılan DNA molekülü,
- DNA polimeraz enzimi
- Primerler
- dNTP karışımı
- Tampon ve $MgCl_2$

A) Kalıp DNA

PCR'da, genomik DNA'lar, plazmit ve faj DNA'ları kalıp olarak kullanılabilir. PCR' de kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA'da kullanılabilir.

B) Polimerazlar

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfattan polinükleotid zincirinin sentezini katalizler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla,

fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır (27, 28). Günümüzde PCR'da yaygın olarak kullanılan bazı termostabil DNA polimerazların adları ve kaynakları; Thersus aquaticus'dan elde edilen Taq DNA polimeraz, Pyrococcus furiosus'dan elde edilen Pfu, Thermus thermophilus'dan elde edilen Tth'i örnek verebiliriz. Taq polimeraz enzimi seçilirken kalıp olarak kullanılacak DNA'nın kaynağı önemlidir (27, 28).

C) Primerler

Gen çoğaltılması dahil PCR'ın birçok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere gereksinim vardır. Genel olarak kullanılan kalıp DNA'ya yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere kullanılan primer 20-30 nükleotid uzunluğunda olmaktadır. Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan ya da ticari olarak elde edilebilirler. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır. Primer tasarımı yapmak için bilgisayar programları da geliştirilmiş olmakla beraber, çoğu zaman araştırıcılar ilgilendikleri genleri ya da DNA parçaların çoğaltmak için kendileri primer tasarımı yapmak durumundadırlar. Tasarım yapılırken mümkün olduğunca dört bazın eşit sayıda kullanımına dikkat edilir. Sonucu olumsuz etkileyebilecek istenmeyen oluşumları en aza indirgemek için önem verilmesi gereken bazı noktalar primerlerin polipürin, polipirimidin ya da tekrarlı bölgeler içermemesi, primer çiftlerinin 3' uçlarının birbirine ya da primer içindeki bir bölgeye tamamlayıcı olmamasıdır (27, 28).

D) dNTP Karışımı

Deoksiribonükleozid trifosfatlar yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsatrasyonlarında kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 100 mikro molar dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Ayrıca optimal dNTP konsantrasyonu; $MgCl_2$ konsantrasyonuna, reaksiyon koşulların, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün boyuna, PCR döngü sayısına bağlıdır. Yapılacak PCR için en uygun dNTP konsantrasyonu deneysel olarak belirlenmelidir (27, 28)

E) Tamponlar ve $MgCl_2$

PCR'da kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılan Taq enzimine özgü olan tampondur. Diğer enzimler için de benzeri tamponlar bulunmakta ve bunlar çoğunlukla satın alınan enzimle birlikte 10x konsantrasyonda sağlanabilmektedir (27, 28).

2.8.1. PCR'nin Evreleri

PCR reaksiyonunda üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürün miktarı, teorik olarak üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır (27, 28).

1. Denatürasyon Evresi:

Bu evrede çoğaltılması istenen çift sarmal DNA; sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarını ayırmak üzere denatüre edilerek tek sarmal haline getirilir. DNA sarmallarının birbirinden ayrılması için uygulanabilecek fiziksel ve kimyasal yöntemler olmasına rağmen 95-100 ^{o}C'ye kadar ısıtmak en basit ve en etkin yöntem olarak uygulanmaktadır (27, 28).

2. Primerlerin Bağlanması (Annealing):

Bu evrede primer adı verilen ve çoğaltılması istenen DNA'ya spesifik olan oligonükleotid, ilk evrede elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine komplementer olan nükleotid dizisi ile hibride olur. Primerler, orijinal (hedef) DNA sarmalının amplifikasyonunu başlatmak amacıyla kullanılırlar. Bu nedenle primer (öncü) olarak adlandırılmışlardır. PCR uygulamalarında kullanılan primerler, minimum 17-19 nükleotidden oluşan oligomerlerdir. Genelde uygulamalarda 0.1–0.5 mikro molar arası primer konsantrasyonları, optimal değerler olarak kabul edilir. Her bir primer, orijinal DNA sarmalının 3' veya 5' sarmalından birinin tamamlayıcısı ve çoğaltacak olan DNA bölgesine özgüdür (27, 28).

Primerlerin bağlanması aşamasında deney ortamının ısısı 40-60 ^{o}C düşürülür. Primer eşleşmesi ve bağlanması için gereken ısı ve süre, amplifikasyon primerlerinin konsantrasyonuna ve uzunluğuna bağlıdır (27, 28).

3. Primerlerin Uzatılması (extension) ve Amplifikasyonu:

Primerlerin bağlanması tamamlandıktan sonra primer hibridleştiği tek ipliğin karşılığını sentezler. Bu sentez için termostabil özelliği olan Taq polimeraz enzimi kullanılır. Bu enzim, DNA sentezi için daha yüksek optimum ısıya sahiptir. DNA kalıbının yapısına bağlı olmak üzere Taq polimeraz enzimi, enzim molekülü başına, saniyede 150 nükleotide yaklaşan spesifik aktive ile 75-80 ^{o}C arasında optimum ısıya sahiptir. Nükleotidleri orijinal DNA sarmalına komplementer olacak biçimde primere ekler ve uzatır. Oluşan yeni DNA sarmalları bir sonraki döngüde primerler için kalıp görevi yaparlar. Primerlerin uzatılması aşamasında 70-75 ^{o}C'lerde ısı uygulanır. 72 ^{o}C' de nükleotid eşleşme hızı; tampon, Ph, tuz konsantrasyonu ve DNA kalıbının yapısına bağlı olarak saniyede 35-100 nükleotid olarak gerçekleşir (27, 28).

PCR uygulamalarında üç evre bir döngü olarak kabul edilir, bir döngü 3-5 dakika sürer ve 20-40 kez tekrarlanır. Bir döngü sonunda sentezlenen ürün, öncekinin iki katı kadardır. Döngü sayısı n olarak kabul edilirse 2n, çoğaltılmış DNA materyalinin miktarını verir. Yaklaşık olarak 2-3 saat süren 20 döngü sonunda bir milyondan fazla amplifikasyon ürünü verir (27, 28).

PCR ile çoğaltılan DNA fragmentleri uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilerek incelenir. Oluşan DNA fragmentleri jel elektrofrezi ile birbirinden ayrılır.

3.Gereç ve Yöntemler

Bu çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.B.D ile Türk Diyabet Cemiyeti Özel Mersin Hastanesine başvuran gönüllü bireyler dahil edilmiştir. Hasta grubu olarak otuz yaşın üzerinde obezite tanısı konmuş 99 birey ile kontrol grubu olarak 100 bireyin kan örnekleri alınmıştır. Öncellikle gönüllü bireyler çalışma hakkında bilgilendirilmişlerdir. Daha sonra 2 ml kan örnekleri alınmıştır. Gruplara hazırlanmış olan anket soruları sorulmuş ve bireylerin çalışma için gerekli bilgileri alınmıştır. DNA izolasyonu, tuz-izopropil alkol çöktürme yöntemi ile yapılmıştır. IRS-2 geninin 1057. kodonunda glisin amino asidinin (GGC), aspartik asit amino asidine (GAC) dönüşümü ile meydana gelen tek nükleotid polimorfizmi (SNP), polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizm yöntemi ile belirlenmiştir.
Çalışma etik kurul onayı:
Bu çalışma için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 27.02.2009 tarih ve 2/24 no'lu etik kurul onayı alınmıştır.

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Elektroforez Tankı (Midicell EC-350)
- Elektroforez Güç Kaynağı (EC-135-90)
- Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- Santrifüj (Nüve)
- Mikrodalga Fırın (Alaska)
- Derin Dondurucu (Arçelik-2031 D)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- Hassas Terazi (AND)
- Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Louramat)
- Etüv (Nüve NF-800)
- Vorteks (VELP)
- Termal Cycler (Techne Progene)

3.2. Kullanılan Kimyasallar

EDTA(SİGMA E-5134)

Tris-Hidrolorid (SİGMA T-7149)

Sodyum klorür (RİEDEL-de Haen)

Sodyum dodesil Sülfat (Sigma l-5750)

Sukroz (Merck M107651.1000)

$MgCl_2$ (Merck M105833.1000)

Borik Asit (Merck M100165.1000)

Triton X (Merck M108603.1000)

Ethidyum bromide (EtBr) (Applichem A1151)

Proteinaz K (Applichem A3830)

Orange G (Applichem A1404)

Agaroz(Applichem A2114)

Gliserol(Merck M104093.2500)

HaeII

Primerler Forward 5'- CTC AGC CTC TTC ACG CCC -3'

Reverse 5'- GCT CCC CCA AGT CTC CTA A -3

3.3. DNA İzolasyonu için kullanılan Çözeltiler

Nüklei Lizis Buffer

Tris-HCL 0.157 gr

$MgCl_2$ 0.1 gr

Triton X 1ml

Sukroz 10.9 gr

Kimyasal maddeler 50 ml distile suda çözüldü ve pH 7.5'a ayarlandı. Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve oda ısısında muhafaza edildi.

Fizyolojik Tampon

NaCl 0.075 gr

Na_2EDTA 0.025 gr

Tartılan kimyasallar 50 ml distile su içerisinde çözüldü. Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

Tampon A

Tris-HCL 0.157 gr

Na_2EDTA 0.074

Tartılan kimyasallar 50 ml distile su içerisinde çözüldü. Distile su ile 100ml gr tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

%10'luk Sodyum Dodesil Sülfat

SDS 1gr

Tartılan kimyasal 10 ml distile su ile çözüldü ve oda ısısında saklandı.

Proteinaz K

Hazır olarak alınan liyofilize 100 mg proteinaz K, 10 ml steril distile su ile çözülerek 10 mg/ml'lik konsatrasyona getirildi ve -20^0C' de saklandı.

Doymuş NaCl Çözeltisi

NaCl 3.50gr

Tartılan kimyasal 10 ml distile su ile çözüldü oda ısısında saklandı.

%70'lik Etil Alkol

Stok etil alkolden 70 ml üzerine 30 ml distile su eklendi.

İzoPropil Alkol

50 ml stok izopropil alkol kullanıldı.

Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler

10 X TBE (TRİ-BORAT-EDTA)

Trisma-Base…….108 gr

Borik Asit…….54.8 gr

Na_2EDTA…….5.44 gr

Distile su ile 1 litreye tamamlanarak çözüldü.

Elektroforez Yürütme Tamponu

10X TBE tampondan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE içerisine 0,5 µgr/ml konsantrasyonda etidyum bromid (EtBr) konularak hazırlandı.

Agoroz Jel Çözeltisi

4.9 gr agaroz, 140 ml 1X TBE içerisinde mikrodalga fırında eritildikten sonra 0,5µgr/ml konsantrasyonda EtBr eklendi.

Orange G Çözeltisi

Na_2EDTA……..2.232 gr

Orange G……200mg

60 ml gliserol ve 40 ml distile sudan oluşan solüsyon içerisinde çözüldü.

3.4. DNA İzolasyonu

- EDTA'lı tüpe alınan kandan 500µl alınarak 1,5 ml'lik steril ependorf tüpüne aktarıldı.
- Üzerine 1ml Lizis tamponu eklendi ve karıştırıldı.
- Tüpler 5 dakika bekletildi ve 13 000 rpm de 10 saniye santrifüj edildi.
- Süpernatant döküldü ve aynı adım bir kez daha tekrarlandı.
- Tüplere 1 ml fizyolojik tampon eklenerek karıştırıldı.
- Bu karışım 13000 rpm de 10 saniye santrifüj edildi.
- Süpernatant döküldü ve dipteki pellet üzerine 300 µl Tampon A eklendi.

- Bu karışım üzerine 10 µl SDS ve 25 µl Proteinaz K konularak karıştırıldı.
- Tüpler 65 ^{o}C'de 45 dakika bekletildi.
- Tüpler oda ısısına getirildi.
- Tüplere 50 µl doymuş sodyum klorür eklenerek 15-20 saniye e karıştırıldı.
- Tüpler 13.000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi
- Süpernatant yeni steril bir ependorf tüpüne alındı.
- Süpernatant üzerine 385 µl izopropil alkol eklendi
- Tüpler yavaşça alt üst edilerek DNA'nın ipliksi bir görünüm alışı izlendi
- 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant döküldü ve dipteki pellet hallindeki DNA üzerine soğuk % 70 etil alkol eklenerek karıştırıldı.
- 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi
- Süpernatant atıldı ve tüpler ters çevrilerek kurutuldu.
- Tüplere 50 µl saf su eklenerek DNA 37 ^{o}C'de bir gece çözülmeye bırakıldı.

3.5. Moleküler Analiz

PCR ortamı 500 µl'lik steril ependorf tüpünde 40 örneklik olacak şekilde hazırlandı. Her 40 örnek için hazırlanan PCR ortamında kullanılan malzemeler ve miktarları şöyledir.

40 örnek için PCR'da kullanılacak malzemelerin miktarları

Su	640 µl
Buffer	100 µl
Dntp	100 µl
F	8 µl
R	8 µl
Mg_2Cl	100 µl
DMSO	40 µl
TAq	9,6 µl
DNA	1,5 µl

Hazırlanan karışım vorteksle karıştırıldı ve her bireye ait protokol numarası içeren 0.5 ml'lik steril ependorf tüplerine eşit miktarda konuldu. Her bireye ait DNA'dan 1,5'er µl eklendikten sonra tüpler termal cycler cihazına sırasıyla yerleştirildi. Termal cycler'da PCR koşulları şu şekilde uygulandı:

95^0C' de 2 dakika……..1 Döngü
95^0C' de 45 saniye……..35 Döngü
62^0C' de 45 saniye…….35 Döngü
72^0C' de 45 saniye…….35 Döngü
72^0C' de 2 dakika……..1 Döngü

PCR reaksiyonu bittikten sonra çıkarılan PCR ürünleri HaeII restriksiyon enzimiyle kesildi. Bunun için öncellikle 40 örnek için reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışım aşağıdaki şekilde hazırlandı.

10 örnek için		40 örnek için
Su	95 µl	380 µl
Buffer Y^+- Tango^{TM}	25 µl	100 µl
Enzim	2-3 µl	12 µl

Hazırlanan bu reaksiyon karışım vorteksle karıştırıldı sonra 40 örneğe eşit şekilde paylaştırıldı. Mikrosantrifüjde kısa bir süre çevrildi. Etüvde 37^oC'de 16 saat inkübasyona maruz kaldı. Süre sonunda örnekler % 3'lük agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu ve jel görünteleme sistemi ile genotipler belirlendi.

3.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm değerlendirmelerde 100 bp'lik marker kullanıldı. Gözlenen bantların moleküler uzunlukları, marker ile karşılaştırılarak belirlendi ve örnekler UV ışık altında jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek değerlendirildi.

Genotiplendirme; 375 bp'lik bandın gözlendiği bireyler mutant genotipi (DD), 375, 219 ve 156 bp'lik bantların gözlendiği bireyler heterozigot (GD) genotipi, 219 ve 156 bp'lik bantların gözlendiği bireyler ise yabanıl genotipi (GG) olarak değerlendirildi.

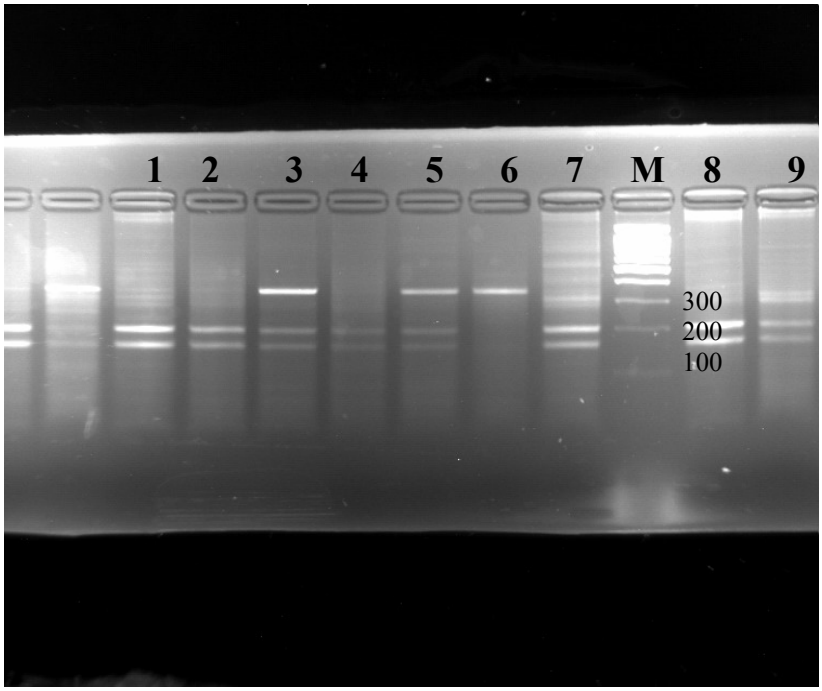
3.7. İstatiksel Analiz

Yaş değişkeni, normallik testi Shapiro-Wilk testi ile test edildi. Yaş değişkeninin gruplarda ve cinsiyetlerdeki farklılıklarını test etmek için Student t testi kullanıldı. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler ise Pearson ki-kare testi ile test edildi. Allellerin her birinin frekansları ve populasyonun denge durumu Hardy Weinberg ile belirlendi. Logistik regresyon analizi yapıldı ve odds oranları ve % 95 güven aralıkları hesaplandı. Analizler SPSS 11.5 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS, version 11.5) paket programı kullanılarak hesaplandı.

4. BULGULAR

IRS-2 genindeki polimorfizmi saptamak üzere hasta grubu (99 birey) ve kontrol grubu (100 birey) olmak üzere toplam 199 bireyin IRS-2 genindeki fonksiyonel polimorfizmi belirlendi. IRS-2 genindeki 1057. kodondaki guanin bazının adenin bazına değişimine bağlı olarak belirlenen D ve G allellerinin oluşturduğu genotipleme yapıldı.

DD genotipi 375 bp'lik bandın gözlendiği bireyler, 375, 219 ve156 bp'lik bantların gözlendiği bireyler GD genotipini, 219 ve 156 bp'lik bantların gözlendiği bireyler ise GG genotipi olarak değerlendirildi.



Şekil 4.2. PCR-RFLP sonrasında IRS 2 geni fragmentlerinin agaroz jelde görünümü

Şekil 4.2.'de IRS-2 geni PCR ürünün HaeII restriksiyon enzimi ile kesiminden elde edilen alleller görülmektedir. 100 bp Marker M olarak ve bireyler 1 ile 9 arasında numaralı olarak gösterildi. 1, 2 ve 4 numaralı bireyler GG genotipini (219 ve156 bp), 3,5 ve 9 numaralı bireyler GD genotipini (375, 219 ve 156 bp), 6 numaralı birey ise DD genotipini (375 bp) göstermektedir.

Çizelge 4.1. Obez ve kontrol gruplarına yaş ve BKİ ortalamaları

		YAŞ ORTALAMALARI	BKİ ORTALAMALARI
OBEZ GRUBU		55.4 ± 10.3	33.7 ± 2.8
KONTROL GRUBU		57.5 ± 10.6	23.6 ± 3.0
CİNSİYET	**KADIN**	56.1 ± 10.8	
	ERKEK	56.9 ± 10.2	

Bu çalışmada BKİ ortalamaları hasta grubunda 33.7 ± 2.8 kontrol grubunda ise 23.6 ± 3.0 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1.) . Yaşlar bakımından kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir (p= 0.161). Yaş ortalamaları obez grubunda 55.4 ± 10.3 iken kontrol grubunda 57.5 ± 10.6'dır. Erkek ve kadınların yaş ortalamalarının birbirine benzer olduğu görülmüştür (p=0.611). Kadınların yaş ortalamaları 56.1 ± 10.8, erkeklerin yaş ortalaması 56.9 ± 10.2 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Obez ve kontrol gruplarına ait genotip frekansları

IRS-2 GENOTİPİ	**OBEZ**	**KONTROL**	**TOPLAM**
GG n	50	51	101
%	50.5	51	50.8
GD n	36	38	74
%	36.4	38	37.2
DD n	13	11	24
%	13.1	11	12

n=Birey Sayısı

Araştırmada toplam 199 gönüllü birey üzerinde çalışılmıştır. Çalışmaya katılan bireylerin genotip dağılımı % 50.8'i GG genotipine, % 37.2'si GD genotipine geriye kalan % 12'i DD genotipine sahip oldukları belirlenmiştir.

Hasta grubunu 99 obezite teşhisi konmuş bireyden, kontrol grubu ise 100 sağlıklı bireylerden oluşturulmuştur. Obez grubunda % 50.5'i GG, % 36.4'ü GD ve % 13.1'i DD genotipine sahipken kontrol grubunda ise % 51'i GG, % 38'i GD, % 11'i DD

genotipine sahip olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.3. Obez ve kontrol gruplarına ait allel frekansları

ALLEL FREKANSI		OBEZ	KONTROL	TOPLAM
G	**N**	136	140	276
	%	69	70	71
D	**N**	62	60	112
	%	31	30	29

N=Allel Sayısı

Obez hastalarda G alelinin gen frekansı 0.69, D alelinin gen frekansı 0.31; sağlıklı bireylerde ise G alelinin frekansı 0.70, D alelinin frekansı 0.30 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.3.). Genotiplerin her iki grupta da Hardy-Weinberg dengesinde olduğu gözlenmiştir (p=0.893).

Çizelge 4.4. G1057D polimorfizmi genotiplerinin obezite ile ilişkisini gösteren OR (odds oranı) ve p değerleri

IRS-2 GENOTİPLERİ	ODDS ORANI	P DEĞERİ	Güven Aralığı (CI %95)	
			Alt Sınır	Üst Sınır
GG		1	(referans)	
GD	0.830	0.682	0.34	2.026
DD	0.802	0.639	0.318	2.018

Çizelge 4.4'te Odds oranları ve % 95 güven aralıkları verilmiştir. IRS 2 geninde 1057. kodonda meydana gelen gen polimorfizmi ile obezite arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Çizelge 4.5. Cinsiyete göre obez ve kontrol grupları

CİNSİYET		OBEZ	KONTROL	TOPLAM
KADIN	**n**	53	48	101
	%	53.5	48	50.8
ERKEK	**n**	46	52	98
	%	46.5	52	49.2

n=Birey Sayısı

Cinsiyetlere göre obez ve kontrol grupları arasındaki ilişkiye bakıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Çalışma grubunun 101'i kadın geriye kalan 98'i erkek bireylerden oluşmaktadır (Çizelge 4.5.). Obez hasta grubunun % 53.5'i kadın geriye kalan % 46.5 ise erkeklerden, kontrol grubunun ise % 48'i kadın geriye kalan % 52'si erkek bireylerden oluşmaktadır.

Çizelge 4. 6. Cinsiyete göre genotiplerin dağılımı.

GENOTİPLER		**KADIN**	**ERKEK**
GG	**n**	54	47
	%	53.5	48
GD	**n**	37	37
	%	36.6	38
DD	**n**	10	14
	%	9.9	14

n=Birey Sayısı

Kadınlarda GG genotipi oranı % 53.5, GD genotipi oranı % 36.6 ve DD genotipi oranı % 9.9 olarak, erkeklerde ise GG genotipi oranı % 48, GD genotipi oranı % 38 ve DD genotipi oranı %14 olarak hesaplanmıştır. Genotiplerin hem kadınlarda hem de erkeklerde Hardy Weinberg dengesinde olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6.). Cinsiyet ile genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p=0.575).

Çizelge 4. 7. Cinsiyete göre allel frekansları.

ALLEL FREKANSLARI		**KADIN**	**ERKEK**
G	**N**	145	131
	%	72	67
D	**N**	57	65
	%	28	33

N=Allel Sayısı

Kadınlarda G allelinin frekansı 0.72, D allelinin frekansı ise 0.28 olarak hesaplanırken, bu durum erkeklerde sırasıyla 0.67 ve 0.33 olarak hesaplanmıştır

(Çizelge 4. 7.). Hardy Weinberg dengesine bakıldığında her iki grubun dengede olduğu gözlenmiştir (p> 0.05).

Çizelge 4.8. Obezite BKİ'ye göre sınıflandırılması.

Obezite Tipleri	**En Küçük Değer**	**En Büyük Değer**
Sınıf I	30	34.9
Sınıf II	35	39.9
Sınıf III	40>	

Çizelge 4.9. Obez grubun BKİ'sine göre genotiplerin dağılımı.

GENOTİPLER		**SINIF I**	**SINIF II**	**SINIF III**
GG	**n**	36	12	2
	%	72	24	4
GD	**n**	28	6	2
	%	77.8	16.7	5.6
DD	**n**	10	2	1
	%	76.9	15.4	7.7

n=Birey Sayısı

Obezite BKİ'ye göre üç sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf I obezite 30 - 34.9 kg/m^2, Sınıf II obezite 35.0- 39.9 kg/m^2, Sınıf III obezite ise BKİ>40 kg/m^2 arasındaki obez hastalardan meydana gelmektedirler (Çizelge 4. 9.).

Obez grubu genotiplerinin BKİ'sine göre dağılımı incelenmiştir. GG genotip Sınıf I oranı % 72.0, sınıf II oranı % 24, sınıf III % 4, GD genotipi Sınıf I oranı % 77.8 ,sınıf II % 16.7, sınıf III % 5.6, DD genotipi Sınıf I oranı % 76.9 olarak, sınıf II %15.4, sınıf III % 7.7 olarak saptanmıştır. Genotipler bakımından incelendiğinde grupların Hardy Weinberg dengesinde olduğu görülmüştür. BKİ değeri ile genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p=0.890).

Çizelge 4. 10. Obez grubun BKİ'sine göre allel frekansları

ALLEL FREKANSI		**SINIF I**	**SINIF II**	**SINIF III**
G	**N**	100	30	6
	%	69	75	60
D	**N**	48	10	4
	%	31	25	40

N=Allel Sayısı

Gruplardaki allell frekanslarının dağılımı çizelge 4.10'da verilmiştir. Hardy Weinberg dengesi açısında her iki grubun dengede olduğu saptanmıştır ($p > 0.05$).

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada, IRS-2 gen polimorfizmi ile obezite arasındaki ilişkinin araştırılarak genetik yatkınlığın belirlenmesi amaçlanmıştır. Obezitede IRS-2 gen polimorfizmlerinin etkilerine dair az bilgi bulunmaktadır. Bu çalışma, IRS-2 gen polimorfizminin Türk obez bireylerde genotiplendirilmesi ve allel sıklıklarının belirlenmesi açısından ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır.

IRS-2 gen polimorfizmindeki GG, GD ve DD genotiplerinin obez bireylerde dağılımı sırayla % 50.5, % 36.4, % 13.1 olarak kontrol grubunda ise % 51, % 38 % 11 olarak saptanmıştır. Obez hastalarda G alelinin gen frekansı 0.69, D allelinin gen frekansı 0.31; kontrol grubunda ise G alelinin frekansı 0.70, D alelinin frekansı 0.30 olarak bulunmuştur. Toplam olarak her iki grupta G allelinin frekansı 0.71, D allelinin frekansı 0.29'dir. Bu çalışmada IRS-2 geni G1057D polimorfizmi ile obezite arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Ouederni ve arkadaşları (29) yaptıkları çalışmada tip 2 diyabet ve obezite ile IRS-2 G1057D polimorfizmi arasında bir ilişki bulmamışlardır. Tunus populasyonunu Berberi ve Arap olmak üzere iki etnik alt grupta incelemişler ve etnik farklılıklara göre polimorfizm açısından bir fark bulmamışlardır. D alleli için hasta ve kontrol grubunda sırasıyla Arap populasyonunda % 17.65, % 20.72 ve Berberi populasyonunda ise % 19.17, % 25 olarak hesaplamışlardır. Bu çalışma allel sıklığı açısından Avrupa populasyonlarında yapılan çalışmalarla ve kendi çalışmamızla kıyaslandığında D allelinin frekansının bu çalışmadaki değerden yüksek olduğu görülmektedir. Sonuçlardaki bu farklılığın etnik varyasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde obezite ve IRS-2 G1057D polimorfizmi arasında bir ilişki saptanmamıştır.

Okazawa ve arkadaşlarının (30) tip 2 diyabeti olan hastalarda yaptıkları çalışmada BKİ ve sistolik kan basıncını ($P < 0.0001$) kontrol grubuna göre hasta grubunda anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Obez bireylerde GG, GD, DD genotiplerinin dağılımları sırasıyla % 36.2, % 51.7, % 12.1, tip 2 diyabet hastalarında ise % 35.5, % 46.8, % 17.7 olarak saptamışlardır. Obez olmayan bireylerde GG, GD, DD genotiplerinin dağılımları % 31.7, % 53.5, % 14.9, tip 2 diyabet hastalarında ise % 29.5, % 59, % 11.5 olarak belirlemişlerdir. G1057D varyantları ile plazma glikoz ve

insülin seviyesi arasında ilişki bulmamışlardır. Çalışmada, allel sıklıkları açısından obez olan tip 2 diyabetli hastalarda D alleli ile anlamlı ilişki bulunmuştur. D allelinin obez bireylerde tip 2 diyabet hastalığı riskini arttırdığını tespit etmişlerdir. Obez olan tip 2 diyabet hastalarında D alleli hipotalomusdaki IRS-2'nin aracılık ettiği sinyalleri bozarak insülin duyarlılığını olumsuz etkileyip leptin direncinin artmasına neden olabilmektedir. Buna karşın obez olmayan bireylerde D allelinin insülin duyarlılığına etkisi olmayabilir.

Bodhini ve arkadaşlarının (31) Asyalı Hintlilerde 1193 sağlıklı birey ile 1018 tip 2 diyabetli hastada yaptıkları çalışmada DD genotipinin obez bireylerde Tip 2 Diyabet riskini 2 kat arttırdığını göstermişlerdir. Bunun en önemli nedeninin Bodhini ve ark. yaptığı çalışmadaki örneklem hacminin büyüklüğüdür. Bu çalışmadaki örneklem hacminin büyüklüğü çalışmamızdaki sayının yaklaşık olarak 12 katı kadardır. Ayrıca çalışmada obez bireylerde GD genotipinin tip 2 diyabet gelişimine karşı koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur. Bu durumun heterozigot üstünlüğünden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Günümüzde IRS-2 G1057D polimorfizmin insülin üzerindeki etkisi açık değildir. IRS-2 molekülündeki amino asit değişimi iki önemli tirozin fosforilasyon alanında (1042 kodon ile 1072 kodon) bulunmaktadır. Bu değişimin alternatif bir sinyal oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir. Bu alternatif sinyalin, tip 2 diyabet gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir.

Yi ve arkadaşları (32) 218 tip 2 diyabetli hastada ve 221 sağlıklı bireyde yaptıkları çalışma sonucunda DD genotipi frekansının obez olmayan diyabet hastalarında obez olmayan kontrol grubuna göre düşük olduğunu saptamışlardır. DD genotipinin obez olan diyabet hastalarında obez kontrol grubuna göre yüksek olduğunu bulmuşlardır. ($p<0.05$).

Mammarella ve arkadaşlarının (33) İtalya'da 193 tip 2 diyabet hastası ve 206 sağlıklı birey ile yaptıkları çalışmada; obez bireylerde DD genotipinin Tip 2 diyabet riskini yaklaşık olarak 6 kat arttırdığını, obez olmayan bireylerde GD ve DD genotiplerinin tip 2 diyabet hastalığı için düşük risk taşıdığı saptanmıştır. Biyokimyasal bulgulara göre D1057 varyantının Tip 2 diyabet hastalığına karşı koruyucu etkisi olmasına karşın aşırı kilolu bireylerde ise Tip 2 diyabet gelişimine neden olduğunu bulmuşlardır. Bu yüzden obezitenin Tip 2 diyabet riski oluşturacak şekilde D1057 varyantının koruyucu etkisini değiştirdiği görülmüştür. Bu durumun en önemli sebebinin Tip 2 diyabeti olmayan bireylerde bu mutasyonun insülin duyarlılığı ile

ilişkili olarak koruyucu etki gösterirken, aşırı kilolu bireylerde ise insülin direnci ve β-hücrelerindeki hasarla ilişkili olduğu saptanmıştır. Obez olmayan bireylerde mutasyonun, IRS-2 sinyalini değiştirerek periferik insülin duyarlılığını arttırdığı ve β-hücrelerinin gelişimi ve canlılığını sağladığı dolayısıyla tip 2 diyabete karşı koruyucu etki yaptığı ancak obez bireylerde ise obezite ile etkileşime girerek tip 2 diyabet riskini arttırıcı etkiye neden olduğu düşünülmektedir.

Lauter ve arkadaşları (34) tarafından İtalya'daki Kafkas populasyonunda IRS-2 gen polimorfizmleri ile obezite arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere 99 morbid obez (sınıf III obez) olan bayan hasta ile 92 sağlıklı bayanla çalışmışlardır. Bu çalışmada 9 tane IRS-2 haplotipini çalışmışlardır. Bunlardan H3, H5 ve H8 olmak üzere 3 haplotip IRS2 G1057D allelik varyantını içermektedir. Bu 3 haplotipten haplotip H3 taşıyan bireylerde obez olma riskini yaklaşık olarak 3 kat arttırdığını saptamışlardır ($p < 0.025$). Yapılan bu çalışmada IRS-2 gen polimorfizmi ile obezite arasında anlamlı ilişki bulunması bizim çalışmamızın verileri ile uyum göstermemektedir**.** Bunun en önemli nedeninin Lauter ve ark.'larının çalışmalarında sadece morbid obez hastalarının olması düşünülmektedir. Çalışmalarındaki morbid obez hasta sayısı bizim çalışmamızdaki sayının 8 katı kadardır.

D'Alfonso ve arkadaşların (20) yaptığı çalışmada İtalya'nın merkezini temsil eden Lazio bölgesinden 186 glikoz toleransı olan birey ile 240 tip 2 diyabeti olan birey ve İtalya'nın güneyini temsil eden Sicilya bölgesinden 123 glukoz toleransı olan birey arasında yaptıkları çalışmada, allel frekansları arasında tip 2 diyabetli olanlarla, olmayanlar arasında etnik köken fark etmeksizin herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Tip 2 diyabeti olmayan G allellinin frekansı Lazio bölgesinde %64.2, Sicilya bölgesinde ise % 66.3'dir. D allellinin frekansı Lazio bölgesinde %35.8, Sicilya bölgesinde ise %33.7 bulunmuştur. Tip 2 diyabeti olan bireylerde G allellinin frekansı % 67.1 D allellinin frekansı %32.9'dir. Tip 2 diyabeti olmayan bireylerde GG genotip frekansı Lazio bölgesinde % 41.4, Sicilya bölgesinde ise % 43.9, GD genotip frekansı Lazio bölgesinde %45.7 ve sicilya bölgesinde ise % 44.7'dir. DD genotip frekansı Lazio bölgesinde % 12.9, Sicilya bölgesinde ise % 11.4 bulunmuştur. Tip 2 diyabeti olan bireylerde GG genotip frekansı %45, GD genotip frekansı % 44.2, DD genotip frekansı % 10.8 hesaplanmıştır. IRS-2 sentezinde, insülinin stimüle ettiği fosforilasyonda ve PI3K'nın alt ünitesi olan p85 bağlanmada herhangi bir sorun bulunmamıştır. Bu

polimorfizm hem tip 2 diyabetlilerde hem de glukoz tolersansı olan birey üzerinde klinik ve biyokimyasal özellikleri ve insülin duyarlılığı ve salınımı üzerine herhangi bir etkisi bulunmamıştır. D'Alfonso ve arkadaşları yaptıkları çalışmada IRS-2 G1057D polimorfizmi ile tip 2 diyabet arasında bir ilişki bulmamışlardır.

Wang ve arkadaşları (19) geç yaşta başlayan tip 2 diyabet ile IRS 2 gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada, Fin'li ve Çin'li tip 2 diyabet hastalarını allel frekansları için kendi kontrol grupları ile karşılaştırmışlardır. Finli grupta D allel frakansı tip 2 diyabetlilerde % 31, kontrollerde ise % 31'dir. Çin'li grupta ise D allel frakansı tip 2 diyabetlilerde % 35, kontrollerde ise % 30 hesaplamışlardır. Hem Çin'li hemde Fin'li hasta ve kontrol grubun Hardy-Weinberg dengesinde oldukları saptanmıştır. Bu çalışmada tip 2 diyabet ile insülin direnci, insülin salgısının bozulması arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır. Bu çalışmaya göre Fin'li ve Çin'li bireylerde IRS 2 geni tip 2 diyabet gelişiminde önemli bir rol oynamamaktadır.

Stefan ve arkadaşlarının (18) yaptıkları çalışmada, Pima yerlilerinde IRS-2 gen polimorfizmi ile tip 2 diyabet arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Tip 2 diyabetli hasta grubunda D allel frekansı 0.6 olarak saptanmıştır. Tip 2 diyabet hastalarında homozigot D genotipinin (DD) frekansını, homozigot (GG) ve heterozigot (GD) genotiplere göre daha yüksek oranda bulmuşlardır (p=0.04). Bu çalışmadaki bulgulara göre Pima yerlilerinde homozigot D genotipinin tip 2 diyabet olma riskini 1.5 kat arttırdığı saptanmıştır. Bunun nedeninin Pima yerlilerinin diğer çalışmalardaki populasyonlardan daha çok obez olmaları ve hem farklı genetik yapıya hem de farklı allel sıklığına sahip olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Türkiye'de obezite ile IRS-2 gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmaya ulaşılmamıştır**.** Ancak Çayan ve arkadaşları (35) IRS-2 Gly1057Asp polimorfizmi ile endometriyal kanserli hastalar ve (36) endometriyozis arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar yapmışlardır.

Özet olarak ; IRS 2 polimorfizmi ile obezite riskini araştıran çalışmalar arasında çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda mutant tip (D alleli) ile risk artışı arasında ilişki saptanırken (34), bazılarında ise bizim çalışmamıza paralel olarak risk gözlenmemiştir (29).

Çalışmamızda, obezite ile IRS-2 gen polimorfizmi arasındaki ilişki hakkında bilgi edinilmesi hedeflenmektedir. Toplumumuza ait genotip yapısı hakkında daha ayrıntılı bir sonuç bildirmek için hasta sayısının arttırılması gerektiğini düşünmekteyiz. Obezite multifaktöriyel bir hastalık olduğu için gen-gen etkileşimleriyle birlikte obezitede etkili olan çevresel faktörleri de göz önüne alan gen-çevre etkileşimlerini içerecek şekilde daha geniş örneklem hacmine sahip farklı populasyonlarda çalışmalar yapılırsa bu konudaki bilgiye önemli katkılar sağlayacaktır. Obezitenin kalıtımdaki yerinin saptanması, populasyonlara göre obezite-IRS-2 ilişkisinin değişiklik gösterip göstermediğinin belirlenmesi, obezite tedavisinin yönlendirilmesi böylece farmakogenetik bilimine katkıda bulunulması ve obez olgulara genetik danışmanlığın verilebilmesi açısından önemli olacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Obezite vücudun aşırı yağ depo etmesi sonucu meydana gelen bir hastalıktır. Genetik, psikolojik, fiziksel, çevresel, sosyoekonomik faktörlerin birbiri ile etkileşimi sonucu meydana gelir. Obezite çok sayıda farklı fenotipik ifadeye sahip olup, gelişim sürecinde etkili olan farklı moleküler mekanizmalar rol oynar.

Obezite tip 2 diyabet, sistemik hipertansiyon, dislipidemi, inme, miyokard infarktüsü, kroner kalp hastalığı, konjektif kalp yetmezliği, uyku apnesi, depresyon, kanser, gastroözofageal reflü hastalığı gibi sağlık sorunlarına neden olmaktadır.

Obezite her yaşta görülebilen multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu durumu etkileyen faktörlerin belirlenmesi hayat kalitesini yükseltir ve obezite ile ilişkili hastalıkların önlenmesinde de etkili olur. Yapılan bu çalışmada, obeziteyi etkilemesi muhtemel genetik faktörlerden birisi olan, IRS-2 gen polimorfizmi ile ilişkisi araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre bu gendeki polimorfizmin, obeziteyle ilişkili olmadığı saptanmıştır. Obezite bir tek gendeki değişim nedeniyle oluşan bir hastalık olmadığı için obezite ile ilişkili olabilecek başka genlerin de çalışıldığı araştırmalar bu konuya daha fazla katkı sağlayacaktır. Sosyo-ekonomik durum, eğitim, hayat tarzı gibi çevresel etmenlerin de eklendiği gen-çevre etkileşim çalışmalarının yapılması da gerekmektedir.

Öncellikle bu çalışmadaki örneklem büyüklüğünün ve yaş aralığının genişletilmesi, obezite ile ilişkili olduğu düşünülen diğer genlerin de incelenmesi, çalışılan hasta grubunun bel çevresi ölçüsü, obezite tipi, açlık ve tokluk glikoz değerleri, C peptid değerleri gibi biyokimyasal verilerin alınması daha anlamlı sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir.

7.KAYNAKLAR

1. **Bray G A.** Risks and pathogenesis of obesity. *Meat Science*, **2005;** 71: 2–7.

2. **Gooren L.** Obesity: new aspects. *JMC ,* **2008;** 5(3) :249–256.

3. **Aronne L J, Nelınson D S, Lıllo J L.** Obesity as a Disease State: A New Paradigm for Diagnosis and Treatment . *Clin Cornerstone*, **2009**; 9 (4): 9-25.

4. **Knecht S, Ellger T , Levine J A.** Obesity in neurobiology. *Prog Neurobiol*, **2008**; 84(1) :85-103.

5. **Mardilovich K, Pankratz S L, Shaw L M.** Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. *Cell Commun Signal,* **2009** ;7:14.

6. **Mutch D M, Cle´ment K.** Genetics of human obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **2006**; 20 (4):647-664.

7. **Undurti N, Das M D**. *Nutrition* xxx **,2009;**1–12.

8. **Schwartz M B, Brownell K D.** Obesity and body image. *Body Image,* **2004;** 1(1): 43–56

9. World Health Organization Expert Committee: PhysicalStatus: The Use and Interpretation of Anthropometry.WHO Technical Report Series no. 854. Geneva, WorldHealth Organization, 1995

10. **KOYUER E.** Obez, tip-II diyabetli hastalarda insülin direnci ile IL-6, crp ve fibrinojen ilişkisi. Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biokimya ve Klinik Biokimya Laboratuarı, İstanbul, **2005**

11. **Clément K**. Genetics of human obesity .*C. R. Biologies*, **2006;** 329: 608 – 622

12. **Reinehr T.** Obesity and thyroid function. *Mol Cell Endocrinol,* **2010;** 316(2): 165–171.

13. **Danforth Jr E, Burger A**. The role of thyroid hormones in the control of energy expenditure. *Clin. Endocrinol. Metab.* **1984;** 13:581–595.

14. **Kim M S , Small C J, Stanley S A, Morgan DG, Seal L J, Kong W M, Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Ghatei M A, Bloom S R.** The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effects of leptin. *J. Clin. Inves,* **2000**; 105: 1005–1011.

15. **Kushner RE, Roth JL**. Assessment of the obese patient. *En docrin 01 Metab Clin North Am,* **2003**; 32: 915 - 933.

16. **Katsilambros N.** New developments in obesity . *Eur J Intern Med,* **2000;** 11(2): 65 – 74.

17. **ALYANAK A.** Pariasiste serum Igf I düzeyleri ve insülin direnci,Uzmanlık Tezi; İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2005.**

18. **Stefan N, Kovacs P, Stumvoll M, Hanson RL, Lehn-Stefan A, Permana PA, Baier LJ, Tataranni PA, Silver K, Bogardus C**. Metabolic Effects of the Gly1057Asp Polymorphism in IRS-2 and Interactions With Obesity. *Dıabetes,* **2003**; 52(6):1544-1550.

19. **Wang H, Rissanen J, Miettinen R, Kärkkäinen P, Kekäläinen P, Kuusisto J, Mykkänen L, Karhapää P, Laakso M.** New amino acid substitutions in the IRS-2 gene in Finnish and Chinese subjects with late-onset type 2 diabetes. *Diabetes,* **2001**; 50(8): 1949-1951.

20. **D'Alfonso R, Marini MA, Frittitta L, Sorge R, Frontoni S, Porzio O, Mariani LM, Lauro D, Gambardella S, Trischitta V, Federici M, Lauro R, Sesti G**. Polymorphisms of the insulin receptor substrate-2 in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab***, 2003**; 88(1): 317-322.

21. **Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R.** Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *The FASEB Journal* ,**2001;** 15(12):2099-3011.

22. **WHITE M F.** IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab,***2002**;283: E413–E422.

23. Erişim: http// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

24. **Marx J.** Cellular warriors at the battle of the bulge. *Scienc ,* **2003**; 299: 846-849.

25. **Pardini AW, Nguyen HT, Figlewicz DP, Baskin DG, Williams DL, Kim F, Schwartz MW**. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. *Brain Res***, 2 0 0 6 ;** 1 1 1 2(1): 1 6 9 – 1 7 8.

26. **KAŞIKÇI T.** Kritik Hastalarda Farklı İnsülin Protokolleri İle Glisemi Kontrolü Uzmanlık Tezi; **S.B.** Göztepe Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2007.**

27. **Temizkan G,ARDA N.** Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler.İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi,İstanbul:Nobel Tıp Kitapevleri, **2003.**

28. **Akar N**.Klinik Moleküler Patolojiye Giriş.Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Yayınlar Serisi 1.Baskı, **2000:** 95-135.

29. **Ouederni TB, Sanchez-Corona J, Flores Martinez SE, Ben Maiz H, Skhiri HA, Abid HK, Benammar-Elgaaied A.** The G1057D polymorphism of IRS-2 gene is not associated with type 2 diabetes and obese patients among ethnic groups in Tunisian population. *Clin Biochem,* **2009;** 42 (10-11): 1169-1173.

30. **Okazawa K, Yoshimasa Y, Miyamoto Y, Takahashi-Yasuno A, Miyawaki T, Masuzaki H, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Nakao K.** The haplotypes of the IRS-2 gene affect insulin sensitivity in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract,* **2005;** 68(1): 39–48.

31. **Bodhini D, Radha V**, **Deepa R**, **Ghosh S**, **Majumder PP**, **Rao MR**, **Mohan V**. The G1057D polymorphism of IRS-2 gene and its relationship with obesity in conferring susceptibility to type 2 diabetes in Asian Indians. *Int J Obes***, 2007;** 31 (1): 97-102.

32. **Yi Kong LF, Zhao YY, Li Q, Zheng XM, Ding Q, Liu H, Liu GL.** Study on the relationship between G1057D variants of IRS2 gene and obese T2DM in Chinese Han subjects. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi,* **2005**; 22 (4): 387-390.

33. **Mammarella S, Romano F, Di Valerio A, Creati B, Esposito DL, Palmirotta R, Capani F, Vitullo P, Volpe G, Battista P, Della Loggia F, Mariani-Costantini R, Cama A.** Interaction between the G1057D variant of IRS-2 and overweight in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet ,* **2000**; 9 (17): 2517-2521.

34. **Lautier C, El Mkadem SA, Renard E, Brun JF, Gris JC, Bringer J, Grigorescu F.** Complex haplotypes of IRS2 gene are associated with severe obesity and reveal heterogeneity in the effect of Gly1057Asp mutation. *Hum Genet,* **2003**;113(1):34-43.

35. **Cayan F, Tok E, Aras-Ateş N, Ayaz L, Akbay E, Gen R, Karakaş S, Dilek S.** Insulin receptor substrate-2 gene polymorphism: is it associated with endometrial cancer. *Gynecol Endocrinol* ,**2010.**

36. **Cayan F, Ertunç D, Aras-Ateş N, Ayaz L, Akbay E, Karakaş S, Coban O, Dilek S.** Association of G1057D variant of insulin receptor substrate-2 with endometriosis. *Fertil Steril,* **2009**.

ÖZGEÇMİŞ

16 Kasım 1984 yılında Antalya'da doğdu. İlkokulu 1991-1995 yılları arasında Barbaros İlkokulunda, ortaokulu 1995-1998 yıllarında Merkez Ortaokulunda, liseyi Atilla-Aldemir Konuk Anadolu Lisesinde 1998-2002 yıllarında okudu.

Lisans eğitimini 2002 - 2007 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde tamamladı. 2007 yılından beri yüksek lisans eğitimine Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbı Biyoloji ve Genetik A.B.D'da devam etmektedir.