



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OBEZİTE İLE İLİŞKİLİ SH2B1 GEN VARYANTLARININ UYKU  
APNESİ İLE BAĞLANTI POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

SERKAN KÜÇÜKTÜRK

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Hasibe VURAL (Cingilli)

KONYA 2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OBEZİTE İLE İLİŞKİLİ SH2B1 GEN VARYANTLARININ UYKU  
APNESİ İLE BAĞLANTI POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

SERKAN KÜÇÜKTÜRK

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Hasibe VURAL (Cingilli)

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinatörlüğü tarafından 141418002 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2017

*Tez Onay Sayfası*

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **SERKAN KÜÇÇÜKTÜRK**' ün "**Obezite ile ilişkili SH2B1 gen varyantlarının uyku apnesi ile bağlantı potansiyelinin belirlenmesi**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Necmettin Erbakan Üniversitesi (N.E.Ü.)-Tıbbi Biyoloji A.D. / 30.03.2017

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Hasibe VURAL (Cingilli)

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D.

İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Sennur DEMİREL

KTO Karatay Üniversitesi

Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyoloji A.D.

İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Tülin ÇORA

Selçuk Üniversitesi

Selçuk Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik A.D.

İmzası

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Şebnem YOSUNKAYA

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Göğüs Hastalıkları A.D.

İmzası

Jüri Üyesi

Yard. Doç Dr. H. Gül DURSUN

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.D.

İmzası

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 13.04/2017 tarih ve 08/09. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası

*Approval*

We certify that we have read this dissertation entitled “*Determination of the potential relationship of obesity related SH2B1 gene variants with sleep apnea*” by “*Serkan KÜÇÇÜKTÜRK*” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Doctor of Philosophy* in the Department of “*Medical Biology*”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan, Meram Faculty of Medicine, Konya, TURKEY / 30.03.2017

Principal Advisor

Assoc. Prof. Dr. Hasibe VURAL (Cingilli)

Necmettin Erbakan University, Meram Faculty of Medicine,  
Department of Medical Biology

Signature

Examination Committee Member

Prof. Dr. Sennur DEMİREL

KTO Karatay University,

Faculty of Medicine

Department of Medical Biology

Signature



Examination Committee Member

Assoc. Prof. Dr.

Şebnem YOSUNKAYA

Necmettin Erbakan University,

Meram Faculty of Medicine,

Department of Chest Disease

Signature



Examination Committee Member

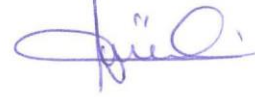
Prof. Dr. Tülin ÇORA

Selcuk University,

Selcuk Faculty of Medicine,

Department of Medical Genetic

Signature



Examination Committee Member

Asst. Prof. Dr.

Hatice Gül DURSUN

Necmettin Erbakan University,

Meram Faculty of Medicine,

Department of Medical Biology

Signature



This thesis has been approved for the Necmettin Erbakan University Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

Date and Signature



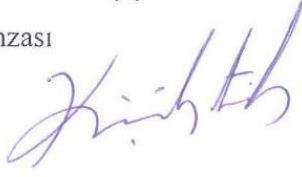
### *Tez Beyan Sayfası*

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamada etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

30.03.2017

Serkan KÜÇÜKTÜRK

İmzası



## ***Teşekkür***

Doktora öğrenimim boyunca yanımda olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan öğretim üyesi Prof. Dr. Sennur DEMİREL'e, 07.09.2016 tarihinden bu yana danışmanlığımı yürüten Doç. Dr. Hasibe VURAL (Cingilli) hocama, Anabilim Dalı başkanı Doç. Dr. Ercan Kurar'a ve bölüm hocalarımızdan Yard. Doç. Dr. Hatice Gül Dursun'a,

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

Eğitim ve tez aşamasında bana desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen eşim Figen Küççüktürk, kızım Beyza'ya ve aileme,

Doktora öğrenimim boyunca yanımda yer almış değerli arkadaşlarıma ve dostlarıma,

Tez önerimi 141418002 proje numarasıyla destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## *İçindekiler*

İç Kapak .....	i
Tez Onay Sayfası .....	ii
Approval.....	iii
Tez Beyan Sayfası.....	iv
Teşekkür.....	v
İçindekiler .....	vi
Kısaltmalar ve Simgeler.....	viii
Tablolar Listesi.....	xi
Şekiller Listesi.....	xiii
Özet .....	xiv
Abstract .....	xv
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. Uykuda Solunum Bozuklukları .....	4
2.2. Uyku Apne Sendromu .....	4
2.2.1. Epidemiyoloji.....	5
2.2.2. Obstrüktif Uyku Apnesinin Fiziopatolojisi.....	6
2.2.3. Etiyoloji.....	7
2.2.4. Klinik Özellikleri .....	8
2.2.5. Polisomnografi (PSG) .....	8
2.3. SNP (Single Nucleotide Polymorphisms-Tek Nükleotid Polimorfizmleri) 10	
2.4. Taguchi Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Metodu .....	13
2.5. Tetra-ARMS PZR (Tetra Amplification-Refractory Mutation System) .....	18
2.6. PZR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) .....	19
2.7. Obezite, Leptin ve Leptin Reseptörü.....	20
2.7.1. Obezite .....	20
2.7.2. Leptin .....	21
2.7.3. Leptin Reseptörü .....	21



2.8. SH2B (Src Homology 2 (SH2) B adaptor protein) adaptör protein ailesi ve hücre sinyallenmesi .....	23
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>27</b>
3.1. Çalışma Popülasyonu .....	27
3.2. DNA İzolasyonu.....	28
3.3. Taguchi Optimizasyon Metodu .....	30
3.4. Genotipleme (Tetra-ARMS PZR ve RFLP).....	33
3.4.1. rs7498665 (NM_001145795.1: c.1450 A>G; p. T484A) .....	34
3.4.2. rs4788102 (NM_001145795.1: c.-1952G>A) .....	35
3.4.3. rs7359397 (NM_001145795.1: c.*518C>T) .....	36
3.5. İstatistiksel analizler .....	37
3.6. Etik Kurul ve Proje Onayı .....	37
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>38</b>
4.1. Taguchi Optimizasyonu .....	38
4.1.1. rs7498665.....	39
4.1.2. rs4788102.....	41
4.1.3. rs7359397.....	43
4.2. Tetra-ARMS PZR, RFLP ve Dizi Analizi.....	45
4.2.1. rs7498665 (c.1450 A>G; p. T484A).....	45
4.2.2. rs4788102 (c.-1952 G>A) .....	47
4.2.3. rs7359397 (c.*518 C>T) .....	49
4.3. Klinik Sonuçlar.....	51
4.4. Polimorfizmlere ait allel ve genotip sıklıkları.....	51
4.5. Genotiplere göre klinik verilerin karşılaştırılması.....	52
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>59</b>
5.1. Öneriler.....	65
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>66</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>72</b>
<b>EK-1 BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU .....</b>	<b>77</b>

## Kısaltmalar ve Simgeler

A, G, C, T	A: Adenin, G: Guanin, C: Sitozin, T: Timin
a.a.	amino asit
AgRP	Agouti ile ilişkili protein;
AHI	Apne Hipopne İndeksi
Alfa ( $\alpha$ )-MSH	$\alpha$ -melanosit uyarıcı hormon
ANOVA	ANalysis Of VAriance, varyans analizi
Asetil CoA	Asetil koenzim A
ASPZR	Allel-Spesifik PZR amplifikasyonu
bç	baz çifti
BDNF	Brain-Derived neurotrophic factor, Beyin-türevli nörotrofik faktör
Bi-PASA	Bidirectional PCR Amplification of Specific Alles
CART	Cocaine-Amphetamine-düzenleyici transkript
CRH	Corticotropin Salan Hormon
DD-	Dimerizasyon Domaini; PH-Prolinden zengin bölge; Y-Trozin veya Tyr
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	deoksiNükleotid Tri Fosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EKG	Elektrokardiyografi
EMG	Elektromiyografi
EOG	Elektrookülografi
F4-M1	Frontal 4-Mastoide 1, C4: Central 4, O2: Occipital 2
FEV1/FVC	Forced Expiratory Volume / Forced Vital Capacity

FTO	Fat mass and obesity-associated protein, yağ kitlesi ve obezite ile ilişkili protein
HDL	High Density Lipoprotein
Inner/ outer	iç / dış
JAK2	Janus Kinaz 2
Kb	kilobaz
Kg	kilogram
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LDL	Low Density Lipoprotein
Lep	Leptin
LepRb	Uzun leptin reseptörü, Ra: kısa leptin reseptörü
m	metre
MC4R	Melanocortin-4 receptor;
MCH	Melanin yoğunlaştırıcı hormon
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
MS	Metabolik Sendrom
NPY	Nöropeptid Y
OD	Optik Dansite
OSA	Obstructive Sleep Apnea- Obstrüktif Uyku Apnesi
POMC	Pro-opiomelanocortin
PSG	Polisomnografi
PTP1B	Protein Fosfataz 1B
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD-PZR	Random Amplified Polimorphic DNAs PZR
REM	Rapid Eye Movement

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rs	reference SNP: rs7498665, rs4788102, rs7359397
S/N ratio	Signal / Noise oranı – sinyal / gürültü oranı veya SN oranı
SDS	SodyumDodesil Sülfat
SH2-B	Src homology 2 (SH2) B adaptor protein
SHP2	SH domain fosfataz 2
SNP	Single Nucleotide Polymorphism- Tek nükleotid polimorfizmi
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3, sitokin sinyal baskılayıcı
STAT3/PI3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3 / Phosphoinositide 3
STR	Short Tandem Repeat veya microsatellites
Tetra ARMS	Tetra Amplification Refractory Mutation System
UAL/LAL	Upper Allowable Limit-İzin Verilen Üst Limit / LAL: Lower Allowable Limit- İzin Verilen Alt Limit
USB	Uykuda Solunum Bozuklukları
UTR	Untranslated region
ÜSY	Üst Solunum Yolu
VKİ	Vücut Kitle İndeksi

## ***Tablolar Listesi***

Tablo 2.1. Yöntemler arasındaki farklılıklar (Ye ve Dhillon 2001) .....	18
Tablo 2.2. Yanlış eşleşme baz seçimi tablosu (Little 2001) .....	18
Tablo 3.1. DNA konsantrasyon değerleri .....	29
Tablo 3.2. Optimizasyonu için Taguchi analizinde kullanılan PZR bileşenlerinin konsantrasyon seviyeleri (parantez içi).....	32
Tablo 3.3. Her biri 4 seviyede olan faktörler için kodlanmış ortogonal tasarım düzeni.	32
Tablo 3.4. Ortogonal tasarım için konsantrasyon göstergeleri .....	33
Tablo 3.5. Tetra-ARMS için kullanılan primerler (rs7498665). .....	34
Tablo 3.6. PZR-RFLP Primer ve enzim özellikleri (rs7498665).....	34
Tablo 3.7. Tetra-ARMS için kullanılan primerler (rs4788102).....	35
Tablo 3.8. PZR-RFLP Primer ve enzim özellikleri (rs4788102).....	35
Tablo 3.9. Tetra-ARMS için kullanılan primerler (rs7359397).....	36
Tablo 4.1. Taguchi deney tasarımına göre yapılan PZR sonuçlarına ait pikler .....	38
Tablo 4.2. rs7498665'e ait S/N oranları için yanıt tablosu. ....	39
Tablo 4.3. rs7498665'e ait ortalamalar için yanıt tablosu. ....	39
Tablo 4.4. rs7498665' e ait S/N oranı, ortalama ve faktör seviyeleri için tahmin edilen değerler.....	40
Tablo 4.5. rs4788102'e ait sinyal gürültü oranları için yanıt tablosu. ....	41
Tablo 4.6. rs4788102' e ait ortalamalar yanıt tablosu. ....	41
Tablo 4.7. rs4788102' e ait S/N oranı, ortalama ve faktör seviyeleri için tahmin edilen değerler.....	42
Tablo 4.8. rs7359397' e ait S/N oranı yanıt tablosu .....	43
Tablo 4.9. rs7359397' e ait ortalamalar yanıt tablosu .....	43
Tablo 4.10. rs7359397' e ait S/N oranı, ortalama ve faktör seviyeleri için tahmin edilen değerler.....	44
Tablo 4.11. Bireylerin gruplara göre antropometrik ve klinik değerleri.....	51
Tablo 4.12. Çalışma gruplarına göre genotip sayıları. ....	51
Tablo 4.13. Zayıf-Hasta ile kontrol gruplarının varyantlara göre genotip sıklıkları.....	52
Tablo 4.14. rs7498665 varyantına ait genotiplerin değişkenlere göre ortalamaları.....	53
Tablo 4.15. Alt gruplarda VKİ'nin genotiplere göre ortalamaları. ....	54
Tablo 4.16. rs4788102 varyantına ait genotiplerin değişkenlere göre ortalamaları.....	55
Tablo 4.17. Alt gruplarda AHI'nin genotiplere göre ortalamaları. ....	56
Tablo 4.18. rs7359397 varyantına ait genotiplerin değişkenlere göre ortalamaları.....	57

Tablo 4.19 Alt gruplarda AHI'nin genotiplere göre ortalamaları ..... 58



## ***Şekiller Listesi***

Şekil 2.1. Patolojik Solunum Olayları.....	9
Şekil 2.2. Bir sistem ya da sürecin genel şeması.....	14
Şekil 2.3. Taguchi ve Geleneksel Kayıp Fonksiyonu. ....	14
Şekil 2.4. Hipotalamik nöronal alt popülasyonlardaki leptin reseptör sinyali. ....	22
Şekil 2.5. SH2B ailesi üyelerinin şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.6. Leptin reseptör sinyal yolağı.....	24
Şekil 2.7. VKİ ile ilişkili genlerin meta-analiz sonuçları ve kromozom lokasyonları. ....	25
Şekil 2.8. SH2B1 üzerinde çalışılan varyantların yerleşimi (NCBI 2017). ....	26
Şekil 4.1. Ortogonal tasarıma göre uygulanmış rs7498665-PZR sonuçları.....	39
Şekil 4.2. rs7498665 Taguchi Plot Grafiği.....	40
Şekil 4.3. Ortogonal tasarıma göre uygulanmış rs4788102-PZR sonuçları.....	41
Şekil 4.4. rs4788102 Taguchi Plot Grafiği.....	42
Şekil 4.5. Ortogonal tasarıma göre uygulanmış rs7359397-PZR sonuçları.....	43
Şekil 4.6. rs7359397 Taguchi Plot Grafiği.....	44
Şekil 4.7. rs7498665 Tetra-ARMS PZR jel görüntüsü. ....	45
Şekil 4.8. rs7498665 RFLP sonuçları. ....	45
Şekil 4.9. rs7498665'e ait dizi analiz sonuçları. ....	46
Şekil 4.10. rs4788102 Tetra-ARMS PZR jel görüntüsü. ....	47
Şekil 4.11. rs4788102 PZR-RFLP jel görüntüsü. ....	47
Şekil 4.12. rs4788102 dizi analizi sonucu.....	48
Şekil 4.13. rs7359397 Tetra-ARMS PZR sonuçları.....	49
Şekil 4.14. rs7359397 RFLP sonucu.....	49
Şekil 4.15. rs7359397 dizi analiz sonucu.....	50

## Özet

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OBEZİTE İLE İLİŞKİLİ SH2B1 GEN VARYANTLARININ UYKU APNESİ İLE BAĞLANTI  
POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Serkan Küçüktürk

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2017

Obstrüktif uyku apnesi (OSA) genellikle obez bireylerde yaygın görülen çok odaklı bir hastalıktır. Obezite ve OSA çoklu patofizyolojik mekanizmaları paylaşmaktadır. Leptin ve reseptörü iştah ve enerji harcanmasının düzenlenmesinden sorumludur. SH2B1 JAK/STAT yolağında leptin reseptörünün hücre içi sinyallenmesinde adaptör ve sinyal artırıcı olarak görev yapmaktadır. Çalışmanın amacı SH2B1 varyantlarının OSA ile bağlantısının olup olmadığını açıklamaktır.

Çalışmaya Konya popülasyonundan cinsiyeti erkek 160 hasta ve 76 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu dahil edilmiştir. Hasta grubu VKİ'ye ( $\leq 25$  kg/m<sup>2</sup> ve  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) göre alt gruplara ayrılmıştır. Klinik olarak uyku ve antropometrik ölçümler ile kan yağları parametreleri karşılaştırmalarda kullanılmıştır. Bütün bireylere polisomnografi testi uygulanmıştır. SH2B1'de bulunan Rs7498665 (G>A), rs4788102 (A>G) ve rs7359397 (C>T) varyantlarının genotiplemesi Tetra-ARMS-PZR ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar RFLP ve dizi analizi ile de test edilmiştir. Ayrıca çalışmada ARMS PZR'ı optimize etmek için Taguchi metodu uygulanmıştır.

Klinik olarak alt gruplarda kan yağları ve boy değişkenleri hariç diğerleri farklı değerlendirilmiştir. Bütün bireyler dahil edilerek her bir varyanta ait genotipler arası karşılaştırma da, üç varyant için mutant genotiplerde VKİ diğer genotiplere göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. AHI rs7498665 hariç diğer iki varyanta ait normal genotiplerde [rs4788102 (A) ve rs7359397 (C)] anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Alt gruplarda da AHI değeri benzer şekilde daha yüksek ve anlamlı çıkmıştır. Taguchi metodu Tetra-ARMS PZR optimizasyonunda kolay ve güvenilir bir şekilde uygulandı.

Sonuç olarak, her üç varyant literatürle uyumlu olarak VKİ ile ilişkiliydi. Ancak rs7498665 hariç rs4788102 ve rs7359397 varyantların normal genotipleri AHI ile ilişkili olarak OSA için risk oluşturabilir. Yapılacak çalışmalar daha fazla örneklem ile Türk popülasyonunda SH2B1 varyantlarının OSA ile bağlantısının araştırılması uygun olacaktır.

Anahtar sözcükler: OSA; Polimorfizm; SH2B1; Tetra-ARMS PZR; Taguchi



## *Abstract*

UNIVERSITY OF NECMETTIN ERBAKAN

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES.

Determination of the potential relationship of obesity related SH2B1 gene variants with sleep apnea

Serkan Küçüktürk

Department of Medical Biology

The Doctor of Philosophy of Thesis / KONYA-2017

Obstructive sleep apnea (OSA) is a very common disease commonly seen in obese individuals. Obesity and OSA share multiple pathophysiological mechanisms. Leptin and its receptor are responsible for regulating appetite and energy expenditure. SH2B1 acts as an adapter protein and signal enhancer in the intracellular signaling of the leptin receptor on the JAK / STAT pathway. The purpose of our study is to explain the relationship of SH2B1 variants to OSA.

The study population of 160 patients from Konya male gender and consisting of 76 healthy individuals were included in the control group. The patient group was divided into subgroups according to BMI ( $\leq 25$  kg / m<sup>2</sup> and  $\geq 30$  kg / m<sup>2</sup>). Clinically, sleep, anthropometric measurements and blood fat parameters were used to compare parameters. Polysomnography test was applied to all the subjects. Genotyping of variants rs7498665 (G>A), rs4788102 (A>G) and rs7359397 (C>T) found in SH2B1 was performed with tetra-ARMS-PZR and confirmed by RFLP and sequence analysis. In addition, the Taguchi method was applied to optimize Tetra-ARMS PCR in the study.

Clinically, the subgroups were statistically different except for blood fat and height variables. In comparison between genotypes of each variant, including all individuals, the BM index in mutant genotypes of the three variants was significantly higher than the other genotypes. The AH index was significantly higher in normal genotypes than the other two variants except rs7498665. Similarly, the AHI score in the subgroups was significantly higher. Taguchi method was applied easily and reliably in tetra-ARMS PCR optimization.

As a result, all three variants were associated with BMI in accordance with the literature. However, except for rs7498665, normal genotypes of variants rs4788102 and rs7359397 may pose a risk for OSA in relation to AHI. With more samples in further research, it would be appropriate to investigate the linkage of SH2B1 variants to OSA in the Turkish population.

Key words: OSA; Polymorphisms; SH2B1; Tetra-ARMS PCR; Taguchi

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

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

Uyku apnesi özellikle cinsiyet, obezite ve yağ dağılımı, üst hava yolu kas tonusu, kraniofasyal morfoloji, genetik faktörler, üst solunum yolu (ÜSY) fonksiyonunun uyku ile ilişkisinden güçlü olarak etkilenen kompleks bir hastalıktır. En önemli patofizyolojik mekanizma uyku süresince üst solunum yolunu açık tutacak dilatör kaslarla ilişkilidir. Solunum beyin kökündeki merkezden kontrol edilir ve genioglossus (dil) aktivesinin önemli bir belirleyicisidir. Bu kontrolün torasik negatif basınca karşı koyacak bir sinyal üretmesi gerekir. Bu durum OSA’lı hastalarda uyku dönemlerine göre değişmektedir. Buna rağmen üst solunum yolu fonksiyonu ve uyku ile ilişkili değişikliklerin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır.

Genel halk sağlığı açısından tedavi edilmeyen uyku apnesi; obezite, hipertansiyon, diyabet gibi metabolik sendrom ve kardiyovasküler hastalıkları etkiler ve yaşam kalitesinde azalmaya sebep olmaktadır. OSA patofizyolojisinin belirlenmesinde genetik olarak farklı aday gen bölgelerinin etkisinin olabileceği de bildirilmektedir. Bunlardan Leptin (Lep) ve hipotalamustaki alıcısı olan uzun leptin reseptörü (LepRb), nörotransmitter olan Nöropeptid Y (NPY) ile obezite ve iştahın kontrolünü sağlayan önemli sinyal yollarından biridir (Redline ve Tishler 2000; Palmer ve ark. 2003; Barcelo ve ark. 2005; Kaparianos ve ark. 2006). LepRb’ye bağlanan leptin, temel olarak bir trozin kinaz olan Janus Kinaz-2 (JAK2)’nin aktivasyonu ile STAT3/PI3-kinaz yollarını kapsayan sinyal olaylarını başlatır (Rawlings ve ark. 2004). STAT3 yolağının bozulması farelerde morbid obezite ve leptin direncine sebep olmaktadır (Bates ve ark. 2003). SH2-B (yeni adlandırmayla SH2B1- Src Homoloji 2 B1) kültüre edilmiş hücrelerde JAK2 aktivasyonunu artırır ve leptin sinyalinin iletilmesinde hızı kontrol eden bir basamaktır. Bundan dolayı SH2B1 hipotalamik nöronlarda leptin duyarlılığını pozitif olarak düzenleyen önemli bir sitoplazmik sinyal molekülüdür (Morris 2009; Morris ve ark. 2010).

Ren ve arkadaşları (2005), yaptıkları deneysel bir çalışmada; SH2B1'deki genetik delesyonun ciddi leptin direnci, hiperfaji ve obezite ile sonuçlandığı göstermişlerdir (Ren ve ark. 2005). SH2B1'deki delesyon, leptinle uyarılmış JAK2 aktivasyonunu ve JAK2 sinyallenme oranını azaltmıştır (Ren ve Li 2005; Chua 2010). Obezite ile ilişkili özelliklerin, SH2B1 ve diğer birkaç bölgedeki varyantlarla bağlantılı olduğu genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında gösterilmiştir (Thorleifsson ve ark. 2009; Sandholt ve ark. 2011). Genomun 16p11.2'deki SH2B1 bölgesini içeren yaklaşık 200 kb'lık delesyonlar obezitenin yanında gelişimsel gerilik ile de ilgili olduğu sonucuna varmışlardır (Bachmann-Gagescu ve ark. 2010; Perrone ve ark. 2010).

Obezite ile ilişkili leptin reseptörünü ve SH2B1 adaptör proteinini kodlayan genlerdeki varyasyonlar işleyişlerini bozabilir ve iletilecek doğru sinyali etkileyebilir. Buna bağlı olarak aynı lokasyonda sadece delesyonlar değil, diğer varyasyonlarda benzer etkilere sahip olabilir. Bundan dolayı hastalığın patofizyolojisinin ve mekanizmasının belirlenmesinde kullanılabilir.

Daha önce bahsedilen bilgiler ışığında, obezite OSA için bir risk faktörüdür. Kilo artışı ile hem genel yağlanma artacak hem de özellikle üst solunum yolu yağ dokularının ve diğer organların etrafındaki yağ dokusu hacminde bir artış meydana gelecektir. Üst solunum yolu etrafındaki yağ dokusunun artışına paralel olarak hastalık şiddetinin göstergesi olan AHI'de doğru orantılı olarak bir artış meydana gelecektir. Bariatrik cerrahi (obezite ameliyatı) sonrası kilo kaybına bağlı olarak VKİ'de 17.9 kg/m<sup>2</sup> lik bir azalmaya karşılık AHI de 38.2 olay/saat'lik bir azalma meydana geldiği gösterilmiştir (Greenburg ve ark. 2009).

Polimorfizmler popülasyonda en az %1 sıklıktan daha az yaygın olan bir varyantın olduğu bölge olarak da tanımlanırlar. Bu varyantlar düşük sıklıkta olmasına karşın bazı durumlarda çok önemlidirler. Özellikle de SNP'ye dayalı polimorfizmler çeşitli hastalıklara katkısı bulunan genlerin bulunması için de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı SNP allelleri, direkt olarak hastalığa katkısı olan gen fonksiyonu veya regülasyonunda farklılığa yol açan DNA sekans varyantlarıdır. Birçok SNP alleli muhtemelen hastalığa küçük miktarda katkıda bulunmaktadır. Bu durum, fonksiyonel SNP'lerin bulunmasında genetik belirteç olarak kullanılmasını sağlamıştır.

Obezite ile ilişkili olarak gösterilen SH2B1 gen bölgesinde bulunan varyasyonlar vücut ağırlığındaki değişime katkı sağlayarak AHI değerindeki riski yansıtabilir. Bunun için daha önceden obeziteye spesifik olan SH2B1 genindeki seçilen üç polimorfizmin rs4788102 (5'-UTR G/A), rs7498665 (ekzon 6- A/G), rs7359397 (3'-UTR C/T) hastalığın ağırlık derecesine (AHI-Apne/Hipopne İndeksi), VKİ' ye (Vücut Kitle İndeksi) katkısı ve allel sıklığının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Çünkü bu tez çalışması sadece klinik olarak hastalıkla ilişkili olan mevcut gen için özgün fonksiyonel SNP'ler üzerinde kurgulanmıştır.

Bu polimorfik bölgelerin genotiplendirmesinde daha önce bu gene uygulanmamış, hızlı ve maliyeti düşük PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'a dayalı Tetra-ARMS (Amplification Refractory Mutation System) yöntemi kullanılacaktır (Newton ve ark. 1989; Ye ve ark. 1992; Little 2001; Ye ve ark. 2001). Bu yöntemdeki en büyük zorluk dört farklı primerin uygun şekilde tasarlanması ve PZR basamağında optimize edilmesidir. Dört farklı primerden dışta iki ortak primer ve içte birer tane normal allel ve risk alleli için tasarlanacaktır. Tek bir reaksiyonda optimize etmek için PZR bileşenlerinin optimum seviyelerde kullanılması gerekmektedir. Bu zorluğu aşmak için ise Taguchi metodu kullanılmıştır (Cobb ve Clarkson 1994; Karna ve Sahai 2012). Taguchi, daha çok endüstriyel süreçte ürün kalitesinin geliştirilmesi için kullanılan bir ortogonal deneme düzenidir. Bu yöntem ile PZR bileşenlerinden Taq polimeraz, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, primer-dış ve primer-iç faktörleri farklı konsantrasyon seviyelerinde Taguchi metoduna uygun olarak çalışılmıştır. Her bir SNP için primer tasarlama ve Taguchi optimizasyonu ayrı ayrı yapılmıştır. Bununla birlikte kontrol edilebilen birden fazla faktörün seçilmesi, farklı konsantrasyon seviyelerinin kullanılmasıyla daha az test çalışması yapılması ve optimum değerlerin belirlenerek moleküler tekniğin geliştirilmesi sağlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Uykuda Solunum Bozuklukları*

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

### 2.2. *Uyku Apne Sendromu*

Uyku apnesinin ilk tanımı 1836’da yayımlanmış “The Posthumous Papers of the Pickwick Club” isimli kitabında “Joe” adlı kahramanı Charles Dickens’a dayandırılır. Joe aşırı uyuyan, gürültülü bir şekilde horlayan ve olasılıkla kalp yetmezliği olan obez bir çocuktur (Guilleminault ve Abad 2004). Burwell ve arkadaşları (1956) Pickwick romanında adı geçen ve sürekli uyuklayan çocuk Joe’ya itafen Pickwick sendromu sözcüğünü türettiler (Burwell ve ark. 1956).

Guilleminault ve ark. (1973), apnenin tanımı (süresi ve tipi) ve apne indeksini (AHI-uyku saati başına düşen apne sayısı) ortaya koymuşlardır (Guilleminault ve ark. 1973). Obez olmayan hastalarda bu sendromun ortaya çıkmasının önemini vurgulamak için daha genel anlamda 1976’da Uykuda Apne Sendromu olarak ifade edilmiştir. Aynı yıl çocuklarda da bu sendromun varlığı gösterilmiştir. 1977 yılında kardiyovasküler komplikasyonlar için geri döndürülebilir bir tehlike olarak hipersomni-uyku apne sendromu tanımlanmıştır (Burack ve ark. 1977). 1983 yılında OSA ile ilişkili kardiyak aritmiler ve iletim bozuklukları tanımlanmış (Guilleminault ve ark. 1983), daha sonra obstrüktif uyku apnesinin sebep olduğu gece uyku bölünmeleri ve gün boyu uyuklama arasındaki ilişki gösterilmiştir (Burack ve Pollak 1977). Bunları OSA’ya bağlı hipertansiyon, miyokardial iskemi ve infeksiyon, serebrovasküler kazalar ve ani ölümlerin incelendiği birçok çalışma takip etmiştir (Guilleminault ve Eldridge 1973; Van Houwelingen ve ark. 1999).

### 2.2.1. Epidemiyoloji

Obstüriktif uyku apne/hipoapne sendromunu çeşitli yaş gruplarını etkileyebilir. Amerikalı yetişkinlerde OSA görülme sıklığı 30-60 yaş arası erkeklerde %4 ve kadınlarda %2 olarak rapor edilmiştir (Young ve ark. 1993). Ancak güncel yatkınlık daha yüksek olabilir. Orta yaş yetişkinlerde erkeklerin %82 kadınların %93'üne klinik olarak tanı konulmadığı tahmin edilmektedir (Young ve ark. 1997). OSA'nın maksimum sıklığı 50 ve 70 yaşlar arasında artmaktadır (Guilleminault ve Abad 2004). Yaş ile OSA arasındaki ilişki karmaşıktır. Birkaç çalışmada orta yaşlı bireyler ile yaşlı bireyler karşılaştırıldığında yaşlı bireylerde daha yaygın olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca erkekler kadınlardan OSA bakımından daha yüksek bir risk taşımaktadır. Sebebi tam olarak açık değildir; fakat hormonal etkiler kısmi bir açıklama sağlayabilir. Kadınlarda menopoz sonrası hastalık riski menopoz öncesinden daha yüksek görülmektedir (Bixler ve ark. 2001).

Obezite, OSA gelişme riskini artırır ve ayrıca ırk da bir risk faktörü olabilir. OSA'nın sıklığı Pasifik Adalarında yaşayanlar, Meksikalı Amerikalılar ve siyahlarda daha fazladır. Siyahlar arasında OSA'nın yüksek olan yaygınlığı alkol ve tütüne maruz kalma veya VKİ'deki farklılıklar hesaba katılmadan 25 yaş altında kalan bireylerde daha belirgin olarak gösterilmiştir. Diğer yandan Avrupalılar ile Maori ve Pasifik adalarında yaşayanlar arasında uyku apnesinin ciddiyetinin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise boyun çevresi, VKİ, yaş gibi faktörler alındığında ırkın uyku apnesinin ciddiyetinde önemli olmadığı gösterilmiştir (Guilleminault 2004). Wisconsin uyku grubunun topladığı bilgiler ışığında hafif dereceli OSA'lı hastalarda vücut ağırlığındaki %10'luk bir artışın orta veya ciddi dereceli OSA gelişimini 6 kat artırdığı ve %1'lik bir değişimin AHI'de %3'lük bir değişiklik yaptığı gösterilmiştir (Peppard ve ark. 2000; Caples ve ark. 2005; Romero-Corral ve ark. 2010). Abdominal obezite, hipertansiyon, artmış kan şekeri, trigliserit ve azalmış HDL kolesterol ile karakterize olan metabolik sendrom (MS) OSA'lılar da daha fazla bulunmuştur (Parish ve ark. 2007). MS ve OSA arasındaki nedensellik henüz gösterilmese de bu iki faktör birbiri ile ilişkilidir (Basoglu ve ark. 2011; Xu ve ark. 2015).

### 2.2.2. *Obstrüktif Uyku Apnesinin Fizyopatolojisi*

OSA uyku süresince solunum çabası devam etmesine rağmen tam (apne) veya kısmi (hipoapne) kesilme ile sonuçlanarak farengeal hava yolunda tekrar eden tıkanmalarla karakterizedir. Hastalar uyanık iken nefes ya da solunum yolu açıklığı ile ilgili bir problem yaşamazlar. Patogeneizde üst solunum yolu (ÜSY) fonksiyonunun uyku ile ilişkili değişiklikler ve üst solunum yolunda gözlenen anatomik olumsuzluklardan etkilenebilir. Buna rağmen üst solunum yolu fonksiyonu ve uyku ile ilişkili değişikliklerin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Uykuda solunum mekaniği üzerine birçok fizyolojik değişiklik eşlik etmektedir. Uyku dışı yanıtın azaldığı sessiz bir dinlenme dönemi olarak görülür. Metabolizma hızı yavaş, üst solunum yolu kasları dahil solunum kaslarında azalmış “ventilatör motor out-put” aktivitesi mevcuttur. Bu aktivite özellikle üst solunum yolu kas aktivitesi ile ilgilidir (Dempsey ve ark. 2010).

Üst solunum yolu; konuşma, yutma ve solunum gibi farklı fonksiyonların gerçekleştiği oldukça kompleks, kollabe olma eğilimli müsküler bir tüptür. Üst solunum yolunun en gevşek bölgesi olan farenks; nazofarenks, velofarenks, orofarenks ve hipofarenks olmak üzere 4 anatomik segmentten oluşmaktadır. Obstrüktif Uyku Apne Sendromlu hastalarda normal bireylere göre ÜSY’de önemli farklılıklar bulunmaktadır ve hava yolu kollapsı hastaların %75’inden fazlasında velofarengal/retropalatal bölgede meydana gelmektedir. Temel olarak yumuşak dokulardan oluşan farenksin, insanlarda diğer memelilerden farklı olarak en üst (burun) ve en alt (larenks) uçları dışında rijit bir desteği bulunmamaktadır. ÜSY’nin kontrollere kıyasla daha küçük ve lateral çapın, antero-posterior çapa göre daha dar olduğu saptanmıştır (Szymanska ve Dobrowolska-Zarzycka 2014). ÜSY’nin lateral darlığı, parafarengal yağ dokusunda ve müsküler farengal duvarda kalınlaşmaya bağlıdır. Dil ve total yumuşak doku hacminde de artış bulunmaktadır ve ÜSY’deki yumuşak doku hacmi OSAS şiddeti ile ilişkilidir (Gharibeh ve Mehra 2010). Bu nedenle farengal kesit alanı yüksek oranda lümen içi basınç ile çevre dokuların oluşturduğu basınç ve dilatör kas aktivitesine bağlıdır (Çiftçi 2012).

Bu nedenle en önemli patofizyolojik mekanizma uyku süresince üst solunum yolunu açık tutacak dilatör kaslarla ilişkilidir. Beyin kökündeki merkezden kontrol edilen solunum kontrolü genioglossus aktivesinin önemli bir belirleyicisidir. Bu kontrolün torasik negatif basınca karşı koyacak bir sinyal üretmesi gerekir. Bu durum OSA’lı hastalarda uyku dönemlerine göre değişmektedir.

REM, non-REM ve uyanıklık dönemlerinde genioglossus negatif basınç aktivitesi de değişiklik göstermektedir (Shea ve ark. 1999). Ancak bu olayın anatomik, mekanik, nöromüsküler, santral, genetik vb. birçok faktörden etkilenmesi nedeniyle oldukça karmaşık hale gelmektedir (Campana ve ark. 2010). Obezite, OSA için büyük bir risk faktörü olmakla birlikte ÜSY etrafında meydana gelecek aşırı yağlanma, tek başına mekanik yük olarak uyku süresince solunum bozulmalarının patogenezi dahil olacaktır (Dempsey ve Veasey 2010).

Yapılan çalışmalarda OSA'nın ailesel bir özellik olarak aktarıldığı söylenebilir (Pillar ve Lavie 1995; Redline ve Tishler 2000). OSA temelinde kalıtılan solunum kontrolündeki anormallikler ve anatomik risk faktörleri arasındaki etkileşimle ilişkili olabileceği de rapor edilmiştir (El Bayadi ve ark. 1990). Bu durum, OSA ve obezite ilişkisi AHI ve VKİ'yi düzenleyen bir veya daha fazla geni içeren çeşitli yollarla açıklanabilir (Koeppen-Schomerus ve ark. 2001; Palmer ve Buxbaum 2003; Gottlieb ve ark. 2007).

### 2.2.3. Etiyoloji

OSA çok sayıda gen içeren, çeşitli çevresel faktörler, gelişimsel faktörler tarafından etkilenen kompleks bir hastalıktır. Bu hastalık tekrar eden üst solunum yolu tıkanmalarına eğilim gösterir. Bu eğilim üst solunum yolu boyutu veya fonksiyonunu etkileyen nöromüsküler ve anatomik faktörler tarafından belirlenir. OSA için en güçlü risk faktörleri obezite ve erkek cinsiyetidir. Diğer risk faktörleri üst solunum yolunun sert ve yumuşak doku özellikleri, solunum kontrolü karakteristikleridir (Guilleminault ve ark. 1984). Bu faktörlerin birçoğu yaş ile değişmekle birlikte çevresel etkiler ve genler tarafından da belirlenebilir. OSA ile ilişkili birçok özelliğin ifadesi obezite, kraniofasyal yapı, santral ve çevresel sinir sistemi fonksiyonlarına etki eden gelişimsel değişime bağlı olarak etkilenebilir. Obezite, kraniofasyal yapı ve solunum kontrolü büyük ölçüde hem genetik faktörlerden etkilenir, hem de OSA'nın ifadesini etkileyebilen alanlardır (Redline ve Tishler 2000).



#### 2.2.4. Klinik Özellikleri

OSA solunum çabası devam etmesine rağmen tam (apne) veya kısmi (hipoapne) kesilme ile sonuçlanarak uyku süresince farengeal hava yolunda tekrar eden tıkanmalarla karakterizedir. Bunlar aralıklı olarak (intermittent) kan gazı bozulmalarına (hiperkapni ve hipoksemi) ve sempatik aktivasyonu da dalgalanmalara yol açan solunum bozulmalarıdır. Gürültülü horlama OSA'nın tipik bir özelliğidir ve birçok durumda bir solunum olayının sonucu kısa bir uyanıklık (arousal) ile sonlanmaktadır. Bu olaylar hastada, uyku ile uyanıklık arasında dalgalanmalar yaptığı için uyku bölünmeleri ve döngüsel bir solunum paterni ile sonuçlanır (Eckert ve Malhotra 2008). Önemli bir belirteç de gün boyu aşırı uyuklamadır (Johns 1993). Bu subjektif bir durum olduğu için belirlenmesi zordur. Klinik açıdan gün boyu uyuklamanın metabolik sebepleri de sorgulanmalıdır. Diğer olası semptomlar tıkanıklık olsun ya da olmasın kısa uyanıklıklar, gece terlemesi, uyku süresince anormal motor aktivitesi, idrar kaçırma, gastro-özofagal reflü, başağrısı, göğüs ağrısı, azalmış lipido, cinsel yetersizlik, konsantrasyon ve hafıza kayıpları, kişilik değişiklikleri ve depresyon olabilir (Houwelingen 1999). Fiziksel muayene de bazı özellikler tanımlanabilir. OSA'lı hastalar sıklıkla hipertansif, aşırı kilolu ve boyun çevresi 40 cm den daha fazladır. Oro-Nasal muayenesinde ise konka hipertirofisi, septal deviasyon, dar ve yüksek sert damak, düşük seviyede uzamış uvula, fazla ve düşük seviyeli yumuşak damak, tonsiller ve adenoidlerin genişlemesi ile orofarenksin daralması, dar maksilla, dar mandibula bulgularını içerebilir (Guilleminault 2004). Bu özelliklerin bir çoğu spesifik değildir ve kesin tanısı yalnız fiziksel muayene ve hasta görüşmesi ile yapılamaz. OSA kesin tanısı için altın standart tanı yöntemi olarak uyku laboratuvarlarında kullanılan Polisomnografi (PSG) testinin yapılması gerekir (Houwelingen 1999).

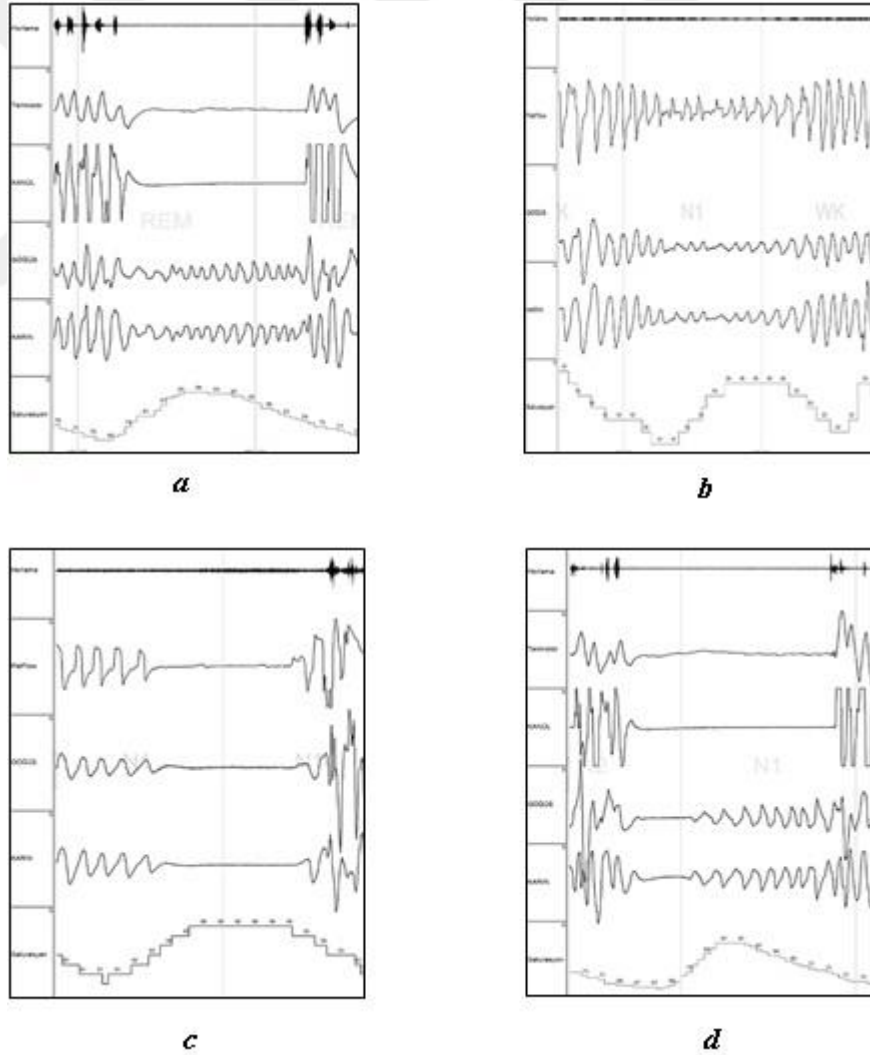
#### 2.2.5. Polisomnografi (PSG)

Kesin tanısı konulacak hastaya uyku süresince durumunu gözleyebilmek için bir gece uyku laboratuvarında tanıya uygun parametreleri içeren polisomnografi testi uygulanır. Bu test oro-nazal hava akımı kayıdı (termistor veya oro-nazal kanül), toraks ve abdomen hareketini kaydetmek için kemer (gerilmeyi ölçmek), 2 kanal EKG (elektrokardiyogram), çene-EMG (submental elektromyogram) ve bacak-EMG (bacak elektromyogram), sağ ve sol EOG (elektrookülogram), 6 kanal EEG (elektroensefalogram F4-M<sub>1</sub>, C<sub>4</sub>-M<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>-M<sub>1</sub>), transkutan oksijen saturasyon probu (pulse oksimetre), horlama sensörü (mikrofon) kayıtlarını içerir (Berry ve ark. 2012).

Ayrıca subjektif bir test olan Epworth uykuölçme ölçeği, gündüz aşırı uyku halini ölçmek için kullanılır ve 10 puan üzeri patolojik olarak değerlendirilir (Johns 1991) .

Uyku süresince saatteki apne/hipoapne sayısı olan apne/hipoapne indeksi (AHI) tanı kriteri olarak önemlidir. Bu hastalığın şiddetinin derecelerine göre sınıflandırılması ise, AHI <5 normal, AHI 5-15 arası hafif dereceli, 15-30 arası orta dereceli, 30 ve daha yukarısı ağır dereceli OSA olarak sınıflanmaktadır (Banno ve Kryger 2007; Berry ve Brooks 2012). Obstrüktif apne, oksijen saturasyonundaki düşme ve uyanıklığa yol açan, göğüs ve karında bir çaba olmasına rağmen ağız ve burundaki hava akışının en az 10 saniye süre ile kesilmesidir. Hipoapne ise; ağız ve burundaki hava akışının %30 ve oksijen saturasyonunun %3'lük düşmesi ya da arousal ile sonlanmalıdır (Berry ve Brooks 2012). Şekil 2.1'de apne örnekleri verilmiştir.

Şekil 2.1. Patolojik Solunum Olayları



Obstrüktif apne (a), Obstrüktif hipoapne (b), Santral apne (c), Mikst apne (d)

### 2.3. SNP (Single Nucleotide Polymorphisms-Tek Nükleotid Polimorfizmleri)

Polimorfizmler popülasyonda en az %1 sıklıktan daha yaygın bir varyantın olduğu bölge olarak da sıklıkla tanımlanırlar. Bu varyantlar düşük sıklıkta olmasına karşın bazı durumlarda çok önemlidirler. SNP'ler iki yolla hastalığa katkısı bulunan genlerin bulunması için kullanışlıdır. Bazı SNP allelleri, direkt olarak hastalığa katkısı olan gen fonksiyon veya regülasyonunda farklılığa yol açan DNA sekans varyantlarıdır. Birçok SNP alleli muhtemelen hastalığa küçük miktarda katkıda bulunmaktadır. Bunların, fonksiyonel SNP'lerin bulunmasında genetik belirteç olarak kullanılması, belirteç SNP'ler ve fonksiyonel SNP'ler arasındaki ortaklık nedeniyle önemlidir.

SNP'ler insan genomunda en sık bulunan genetik varyasyonlardır. Bir genetik varyasyonun polimorfizm olarak tanımlanabilmesi için bir popülasyondaki sıklığının en az %1 olması gerekmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla SNP'lerin tanımlanması ve genomda sık bulunmaları ile genomda kararlı bir şekilde dağılım göstermeleri nedenleri ile SNP'ler tercih edilen moleküler belirteçler olmuşlardır.

SNP'ler günümüzde birçok hastalıkla ilişkilendirilen, tanı koymada gerekli ve kişiye özgü tedavilerin geliştirilmesinde kullanılabilen genetik değişimlerdir. Hastalığın tedavi edilmesinde ilaç etkinliğini etkileyen pek çok genetik polimorfizm için, bir ilaç engelinin yokluğunda belirli bir fenotip yoktur. Bu hastalar için uygun terapilerin seçiminde eğer daha önceden bireyin genotipi bilirse daha iyi klinik kararlar alınabilir. Pek çok polimorfizmin yan etkiye sebep olmasının nedeni, tek nükleotid değişiklikleri olduğu için, bir bireyin SNP profili terapiye rehberlik etmesi, erken teşhisin sağlanabilmesi, belirteç olarak tanımlanması veya klinik bir denemeye katılımın seçimi için tercih edilebilir. İnsan genomunun büyüklüğünün  $3 \times 10^9$  baz çifti olduğu ve SNP'lerin ortalama olarak her 1000 nükleotitte bir meydana geldiği bilindiğine göre, insan genomunda 3 milyondan fazla SNP vardır. Fakat bir gendeki tek nükleotid değişikliklerinin tümü fenotipik bir etkiye (genetik hastalık) yol açmaz. Bunun sebebi değişikliğin proteinin primer amino asit (a.a.) dizilimini değiştirmemesi veya eğer değiştiriyorsa da sonuç değişikliğin proteinin fonksiyonel özelliklerine etki etmemesidir. Fakat mutasyona uğrayan gen; genetik olarak farklılık gösterir ve değişiklik tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak bilinmektedir. SNP'ler aynı zamanda genomun kodlamayan bölgelerinde de meydana gelmektedir.

Ayrıca SNP'ler en çok tercih edilen markırlardır, çünkü ortalama her 1000 bazda bir meydana gelirler. Eğer karşılık gelen özellik sitogenetik olarak görülebilen bir kromozom anomalisi ile eşleşmişse, ilgilenilen genin tam lokasyonunu bulmak kolaylaşmaktadır.

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

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

SNP değişiklikleri ile çalışmak, DNA parçacığında büyüklük farkı yaratan diğer polimorfizmlerle (örneğin STRP-Short Tandem Repeat Polymorphism) çalışmaktan farklıdır. STRP'ler 1-6 bç olarak tekrar eden yaklaşık 100 bç uzunluğunda bir seri olabilen kısa DNA dizileridir (Payseur ve Cutter 2006).

SNP'lerde ise; tek bir baz başka bir baza değişmektedir ve büyüklük farkı oluşmadığı için bu bölgeleri PZR metodu ile çoğaltıp jelde oluşturacağı büyüklük farkları açısından değerlendirmenin bir anlamı yoktur. Ancak SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) metodu diğer genotipleme yöntemlerinden farklı olarak PZR' den sonra 10 dk denatüre edilen PZR ürünleri hızlıca buz üzerine alınır. Daha sonra denatüre edici olmayan poliakrilamid jel elektroforezi ile birlikte uygulanır ve gümüş boyama metodu ile jeldeki fragmentler görünür hale getirilir. Burada bir DNA ipliğindeki tek baz değişimlerinin meydana getirdiği üç boyutlu yapısal değişikliklerin jelde farklı hareket etmesi ve farklı bant profillerini oluşturmasıdır (Haidong 2005).

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

Oluşan değişiklik belli DNA bölgelerini tanıyıp kesen enzim bölgelerinde oluşmuşsa, ilgili enzimin DNA'yı kesip kesmemesini denemeye dayalı DNA'yı kesen enzimlerin oluşturduğu parça uzunluk polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) de kullanılabilir (Ota ve ark. 2007). Yine bu değişimi florasan işaretlerle tanıyan otomatik analizatörlerin bu amaçla kullanılması da pahalı, fakat etkin yöntemlerdir (Takatsu ve ark. 2004).

Bir DNA'daki SNP'lerin paternleri haplotip olarak bilinmektedir. Belirli bir kromozomal bölgedeki tüm SNP'ler, ilişiksiz bireylerin geniş gruplarında analiz edildiğinde, sonuçlar, her biri sınırlı çeşitlilikte fakat belirgin rekombinasyon bölgelerince işaretlenmiş, ondan yüzlerce kilobaza değişen farklı haplotip bloklarının bir görüntüsünü verebilmektedir. Geniş bloklar birçok gen içerebilir; daha küçük bloklar ise sadece bir geni tanımlayabilir. Bu durumda hastalığı anlamamız için daha kullanışlı olabilir. Bir hastalık birden fazla gen tarafından etkileniyorsa; haplotiplerden elde edilecek bilgi SNP'lerden bir seferde elde edilecekten daha fazla olabilir. Assosiasyonlar tek SNP'den ziyade haplotip çalışmalarıyla daha iyi yapılabilir. Belirli bir haplotip alt yapısı üzerinde mutasyon meydana gelir ve yakınındaki SNP'lerle, rekombinasyon veya geri mutasyonla bu birliktelik kopana dek, ilişkilendirilme sürdürülebilir. Haplotip bloklarının varlığı LD (Linkage Disequilibrium) analizini oldukça basitleştirir.

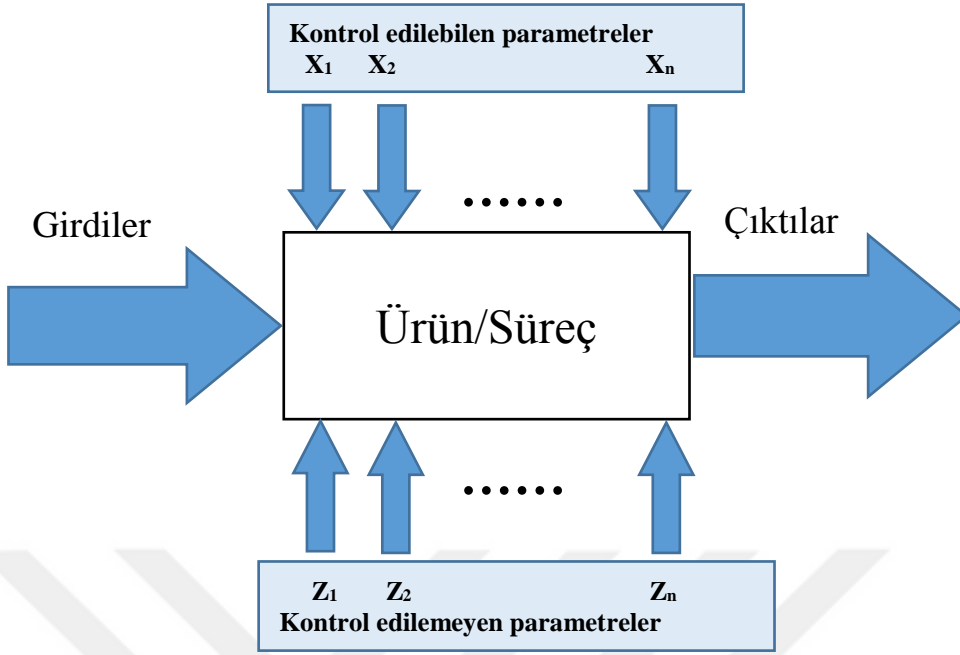
Bir bölgedeki tüm SNP'leri kullanmak yerine, tam olarak hangi SNP'lerin gereksiz olduğunu ve hangilerinin assosiasyon çalışmalarında bilgi verici olduğunu belirleyebiliriz. Haplotiplerin tanımlanmasının medikal uygulamalar için pek çok anlamı vardır, fakat bu tez çalışması sadece klinik olarak hastalıkla ilişkili olan mevcut gen için özgün fonksiyonel SNP'ler üzerinde kurgulanmıştır.

#### 2.4. *Taguchi Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Metodu*

Japon bilim adamı Genichi Taguchi makine mühendisi ve bir istatistikçidir. Yaptığı çalışmalarla istatistiksel deney tasarımına dayalı ürün kalitesini artıracak ve maliyeti düşürecek bir yöntem geliştirmiştir. Taguchi, çok sayıda deneysel durumu açıklamak için ortogonal dizileri oluşturmuştur. Ortogonal dizinin en önemli özelliği, birçok faktörün en az sayıda test edilmesi ve faktör seviyelerini eş zamanlı olarak değiştirme yapmaya olanak sağlamasıdır. Ortogonal tasarımda her bir deneme birbirinden bağımsızdır.

Örneğin, Taguchi deney tasarımı için; 5 faktörlü 4 seviyeli olan L16 ( $4^5$ ) deneme düzeni seçilirse, tam faktöriyel tasarıma göre 4 seviyeli 5 faktörlü bir çalışma için  $4^5=1024$  adet deneme yapılması gerekmektedir. Ayrıca bu denemelerin 3 tekrarlı yapıldığı düşünülürse  $1024*3=3072$  deneme gerçekleştirilmesi gerekir. L16 ortogonal tasarım sayesinde 16 denemeye düşmektedir. Yapılacak bir çalışmada bir sistem veya sürecin gözlemlenmesi, sürecin ve sistemin nasıl çalıştığına öğrenilmesi ve anlaşılması açısından deneyler önemli ve ayrılmaz bir parçadır. Ayrıca yapılan her bir deney aynı zamanda bir testtir. Ürün/sürece kontrol edilebilen ve edilemeyen çeşitli parametreler etki eder. Bu testler bir süreç ya da sistemin girdilerinde değişiklik yapılarak çıktılarının gözlemlenmesi ve analiz edilmesini sağlamaktadır Şekil 2.2, (Roy 2010; Montgomery 2012). Taguchi metodu olarak bilinen bu yöntem ortogonal deney tasarımına dayanmaktadır.

Şekil 2.2. Bir sistem ya da sürecin genel şeması.

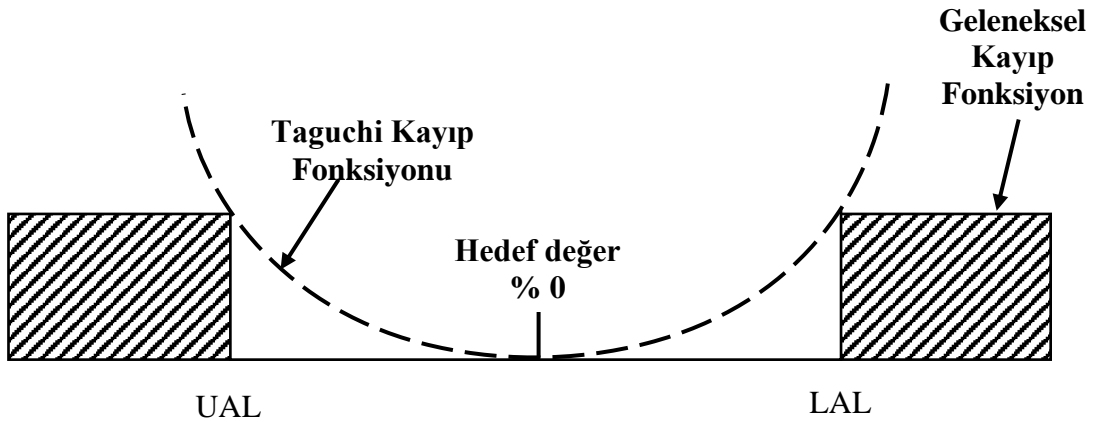


X, Z: Faktör (Montgomery 2012).

Taguchi, kalite kayıp fonksiyonunu ise hedef değerden sapmalar olarak tanımlamıştır ve hedefte kayıp sıfırdır (Şekil 2.2). Bu yöntemle farklı parametrelerin farklı seviyeleri arasından optimum kombinasyonu belirlenebilir (Taguchi 1993; Taguchi ve ark. 2005; Roy 2010). Kalite karakteristiğinin seçimi için ortalama ve standart sapmalar yerine sinyal/gürültü oranlarını (S/N -Signal/Noise- ratio) kullanmıştır (Gaonkar ve ark. 2016).

*Taguchi kayıp Fonksiyonu;*

Şekil 2.3. Taguchi ve Geleneksel Kayıp Fonksiyonu.



UAL: Upper Allowable Limit-İzin Verilen Üst Limit; LAL: Lower Allowable Limit- İzin Verilen Alt Limit (Roy 2010).

Taguchi kayıp fonksiyonunun aynı zamanda sinyal gürültü oranı olarak da bilinen en çok kullanılan 3 fonksiyonu vardır. Bu fonksiyonlar “*daha büyük daha iyi*”, “*en küçük en iyi*” ve “*hedef değer en iyi*” olarak ifade edilir (Unal ve Dean 1990; Zambanini 1992; Taguchi ve Chowdhury 2005; Gökçe ve Taşgetiren 2009; Roy 2010).

Kalite karakteristiğinin “*daha büyük daha iyi*” olduğu durumdaki kayıp fonksiyonu,

$$L(y) = k\left(\frac{1}{y^2}\right)$$

Bu fonksiyonda  $L(y)$  hedef değerden uzaklaştıkça oluşan kalite kaybını,  $y$  ürün veya sürecin güncel değerini,  $k$  ise kalite kaybını gösteren sabittir. Bu formüle göre amaç  $y$  değerini maksimize etmek, yani  $y$  büyüdükçe kalite kaybı azalmaktadır.

Sinyal gürültü oranının hesaplanmasında “*daha büyük daha iyi*” olduğu durumda aşağıdaki kayıp fonksiyonunun logaritmik formülü ile hesaplanır. Optimum koşullarda en yüksek sinyal gürültü oranına sahiptir.

$$S/N = -10 \log \left( \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right)$$

Burada  $y_i$  = Performans karakteristiğinin  $i$ . gözlem değeri  $n = 1$  denemedeki test sayısı,  
 $y$  = gözlem değerlerinin ortalaması

Probleme uygun ortogonal dizinler serbestlik derecelerine göre belirlenir. Her faktörün serbestlik derecesi faktör seviye sayısının bir eksiğidir. Buna göre 5 faktörün 4 seviyeli serbestlik derecesi toplamı 15 olacaktır. En küçük ortogonal tasarım  $L_{16} (4^5)$  olacaktır.  $L_d (a)^k$  ya da  $L_d$  olarak ortogonal dizisi için  $d$ : Toplam deney sayısı,  $a$ : Faktörlerin düzey sayısı,  $k$ : Faktör sayısı,  $L$ : Ortogonal diziyi gösterir.



Taguchi metodunun aşamaları aşağıdaki gibi özetlenebilir (Unal ve Dean 1990; Taylan 2009; Roy 2010);

1. Problemin tanımlanması, değerlendirilecek faktör ve etkileşimlerin seçilmesi
2. Faktör düzeylerinin seçilmesi
3. Performansın değerlendirilmesi için gürültü oranının seçimi
4. Uygun ortogonal düzenin seçilmesi
5. Faktör veya etkileşimlerin kolonlara atanması
6. Testlerin yapılması
7. Sonuçların analiz edilmesi
8. Doğrulama deneylerinin yapılması

Taguchi, sonuçların analiz edilmesinde standart yaklaşım (ANOVA ve ana etki hesaplanması) yerine S/N oranlarını şiddetle tavsiye etmiştir. Bu değer (S/N) ne kadar büyükse hedef değer etrafındaki varyans o kadar küçüktür. Elde edilecek S/N oranı tablosu ve ortalama tablosundan en yüksek S/N oranına sahip seviye optimum değer olarak seçilir. Etki sırası herbir faktör için en yüksek ve en küçük S/N değerleri arasındaki fark alınarak hesaplanır. Her faktör için belirlenen bu değer büyükten küçüğe doğru sıralanır ve en büyük değer en çok etki eden değer olarak belirlenir (Roy 2010).

Belirlenen optimum değerler ile öngörülen değer (predicted value) dikkate alınarak tekrar test yapılır ve ürünün performansı hesaplanmış öngörülen değerler ile karşılaştırılarak değerlendirilir. Performansın değerlendirilmesinde öngörülen değer veya üzerinde bir değer çıkması test sonuçlarını onaylar. Sonucun öngörülen değerden farklı çıkması durumunda zayıf ortogonal tasarım ya da büyük varyasyon gösterdiği düşünülür (Dehnad 1989; Taguchi ve Clausing 1990; Unal ve Dean 1990).

Taguchi tasarımının PZR uygulaması 1994 yılında RAPD-PZR (Random Amplified Polimorfic DNAs) optimizasyonunda kullanılmıştır. Burada elde edilen tek bir pik değeri, hesaplamalarda kullanılmış ve standart koşullara göre ürün miktarında artış meydana gelmiştir (Cobb ve Clarkson 1994). 1996'da iki deneysel tasarım tekniği ( $2^k$  fraksiyonel deney tasarımı ve merkezi kompozit tasarım) kullanılarak otoklavlanmış kan lekesi, DNA izolasyon metodu, 2X2 mm çapında farklı sayılarda kan lekeleri, kalıp DNA miktarı ve  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu için PZR koşulları optimize edilmiştir (Boleda ve ark. 1996).

Taguchi metodu, Minitab istatistik programı yardımı ile uygun şekilde yapılabilir. Gerekli parametreler, faktör ve seviyeler, ortogonal dizinin belirlenmesi ve analizler Minitab istatistik programında bulunan Stat>DOE>Taguchi menüsünden girişleri yapılarak program başlatılır (<http://support.minitab.com/en-us/minitab/17/>).

## 2.5. Tetra-ARMS PZR (Tetra Amplification-Refractory Mutation System)

The Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) metodu allel-spesifik PZR amplifikasyonu (AS-PZR) olarak da bilinir. ARMS tek baz değişiklikleri veya küçük delesyonlar gibi mutasyonları taramak için kullanılan basit, ucuz ve güvenilir bir PZR tabanlı genotipleme yöntemidir. Bu teknikte, bir PZR primerinin 3' ucu allel spesifik olması gerekir. Tetra-ARMS PZR metodu, Tetra-primer PZR ve Bi-PASA (Bidirectional PCR Amplification of Specific Allles) yöntemleri arasında bazı farklılıklar vardır Tablo 2.1, (Newton ve Graham 1989; Ye ve Humphries 1992; Little 2001; Ye ve Dhillon 2001; Medrano ve de Oliveira 2014).

Tablo 2.1. Yöntemler arasındaki farklılıklar (Ye ve Dhillon 2001).

	<b>Tetra-Primer ARMS PZR</b>	<b>Tetra-Primer PZR</b>	<b>Bi-PASA</b>
İnner (iç) Primerler			
Allel spesifik yanlış eşleşme	3' ucundaki baz	Primerin merkezinde	3' ucundaki baz
İlave yanlış eşleşme	Evet, 3' ucundan -2. baz	Hayır	Hayır
Uzunluk	Yaklaşık 28 baz	Yaklaşık 15 baz	Kuyruk dışında yaklaşık 20 baz
Kuyruk	Hayır	Hayır	Evet
İnner/Outer (iç/dış) primer oranı	10	1	1
Annealing sıcaklığı	Sabit veya Touchdown	İlk döngülerde yüksek	Sabit

Tetra Primer ARMS yönteminde primerlerin spesifikliğini artırmak için “-2.” pozisyonunda yapılacak ilave bir yanlış eşleşme baz seçimi olacaktır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Yanlış eşleşme baz seçimi tablosu (Little 2001).

	<b>Primerde bir önceki nükleotide karşılık gelen kodlanan iplikteki nükleotid</b>			
Uç yanlış eşleşme	A	G	C	T
AA	A	G	A	G
AG	C	T	A	G
AC	G	A	C	T
TT	C	T	A	G
TG	G	A	T	C veya T
TC	C	T	A	G
CC	C	T	A	G
GG	A	G	A	G

## 2.6. PZR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

PZR-RFLP tekniğinde, öncelikle ilgilenilen varyasyon bölgesini içine alan ve belli bir baz çifti uzunluğunda amplifiye olmasını sağlayan bir çift primer dizayn edilir. Daha sonra PZR ile amplifiye olmuş üründe varsayılan değişiklikleri tanıyan DNA kesim enzimleri [Restriction Endonucleases (RE)] belirlenir. RE bakterilerde, bakteriyel virüslere karşı hücrenin savunma sisteminde yer alır ve geniş bir çeşitlilikte bakterilerden izole edilir. Bu enzimlerin sınıflandırılmasında cins ismin ilk harfi, tür isminin ilk iki harfine göre isimlendirilir. PZR ile amplifiye edilen DNA dizisindeki enzim tanıma bölgesinde meydana gelecek değişiklik ile enzimin DNA'yı kesme kalıbı değişecektir. Buna göre farklı boyutlarda fragmentler oluşacaktır. Bu farklı uzunluktaki fragmentler agaroz jel elektroforezi ile görüntülenebilir. Bu enzim kesim özellikleri polimorfik nitelikteki genetik göstergelerin bir örneği olarak kabul edilir (Dib ve ark. 1996; Ota ve Fukushima 2007).

## 2.7. Obezite, Leptin ve Leptin Reseptörü

### 2.7.1. Obezite

Obezite OSA için en büyük risk faktörlerinden birisidir (Redline ve Tishler 2000). Vücut kitle indeksi (VKİ - Body Mass Index: BMI) vücut ağırlığının (kg) boy uzunluğunun (m) karesine bölünmesi ile elde edilir. Obez ve obez olmayan bireyleri ayırmada yaygın olarak kullanılır. BMI, 25-29.9 arası olanlar aşırı kilolu 30 ve daha yukarı olanlar obez olarak tanımlanmıştır (Marik 2000).

Obezitenin orta yaşlı erkeklerde gözlenen birçok belirli etkisi vardır ve OSA riskini 10-14 kat artırdığı gözlenmiştir. Obezite göğüs duvarındaki kompliansı azaltması ile ilişkili hipoventilasyonun ortaya çıkması ve/veya azalan nazofarengeal çap, üst solunum yolu dokularında yağ birikmesi OSA'a olan yatkınlığı artırabilir (Redline ve Tishler 2000). Aşırı vücut yağı, özellikle ekspirator rezerv hacminde azalma ve FEV<sub>1</sub>/FVC oranında artma şeklinde solunum sisteminde birkaç etkiye sahiptir. Vital kapasite, total akciğer kapasitesi, fonksiyonel rezidüel hacim genel olarak orta derecede obez olan normal bireylerde korunurken morbid obez bireylerde %30 ve daha fazla azalır.

Solunum olayının günlük yüksek olan karbondioksit üretimini azaltması kadar anormal göğüs elastikiyeti, göğüs duvarı direnci, hava yolu direnci, anormal diyafragmatik pozisyon ve üst hava yolu direncide artmaktadır. Ciddi obez hastalar ventilasyon-perfüzyon uyumsuzluğuna sebep olan genişlemiş alveolar-arteriel oksijen değişimi ile sık sık hipoksemiktir.

Dahası obezite pulmoner trombo-embolizm için büyük bir risk oluşturmaktadır. Obezitenin etyolojisi uzun bir periyot boyunca pozitif bir enerji dengesine sebep olacak potansiyele sahip birkaç faktör ile birlikte heterojen bir durum oluşturmaktadır. Bu faktörler yüksek bir yağ diyeti, alışılmış düşük seviyeli bir fiziksel aktivite, belirli bir vücut kitlesi ve kompozisyonu için düşük bir dinlenme metabolik hızı, açlık durumunda (standart koşullar altında lipidlerden daha çok karbonhidrat oksidasyonuna eğilim gibi) daha yüksek bir solunum oranı, muhtemelen yüksek insülin duyarlılığını içerebilir. Birçok obez bireyde dolaşımdaki yüksek leptin seviyeleri bir leptin direnci göstergesi olabilir (Marik 2000).

### 2.7.2. *Leptin*

Zhang ve arkadaşları tarafından 1994 yılında keşfedilen *leptin*, sitokinlere benzeyen ve 167 amino asit içeren protein yapısında bir hormondur (Zhang ve ark. 1994). İnsanda 7'inci kromozomun uzun kolunda bulunan (7q31) ob/ob geninde kodlanmıştır. Üç ekzon ve iki introndan oluşur. Vücutta başlıca adipoz (yağ) dokuda sentezlenen leptinin az miktarda ise plasenta, gastrik epitelyum, iskelet kası, hipofiz ve meme bezi tarafından da salgılandığı gösterilmiştir. Serbest ve proteine bağlı olmak üzere kanda iki formda bulunmaktadır. Leptinin aktivitesinden serbest formunun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda obez bireylerde serumdaki leptinin büyük kısmının serbest formda olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda obez kişilerde serbest leptin formunun artışının tespit edilmesi, obezite gelişiminde asıl sorunun leptin eksikliği değil, leptin direnci olduğu hipotezini destekleyen kanıtlardan biri olarak görülmektedir (Ogawa ve ark. 2004; Ragin ve ark. 2009). Örneğin, çoğunlukla tip II diyabette olduğu gibi reseptör ve intrasellüler sinyal bozuklukları obez bireylerde leptin direncinden sorumlu olabilir. Leptin enerji alımı veya harcanmasını, nöroendokrin fonksiyonu düzenleyen birkaç nörepeptidin ifadesini değiştirmek için hipotalamustaki spesifik reseptörlere bağlanarak çalışır. Leptin iştahın güçlü bir stimülatörü olan hipotalamik nöropeptid Y (NPY)'nin sentezini engeller (Larter ve ark. 2010) Şekil 2.3). Dahası NPY'nin azaltılması enerji harcanması ve sempatik sinir sistemi çıkış akımının artmasıyla sonuçlanmaktadır (Wang ve ark. 1997; Loh ve ark. 2015).

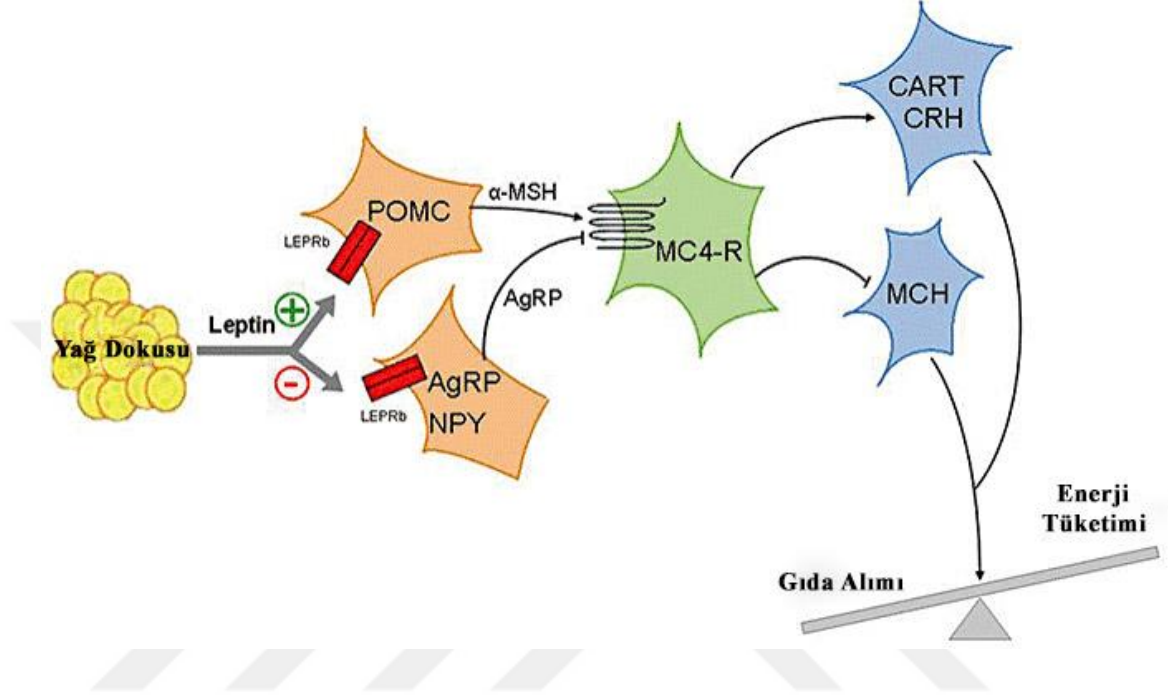
Leptin direkt olarak lipid oksidasyonunu arttırması ile birlikte yağ asidi ve trigliserit sentezini azaltarak intrasellüler lipid artışını engeller. Lipid metabolizmasına etkisi, yağ asidi sentezinde enzim hızını sınırlayarak, asetil KoA karboksilaz aktivitesini engelleyen bir etki olabilir (Gao ve ark. 2007).

### 2.7.3. *Leptin Reseptörü*

Leptin reseptörü, sitozolik transkripsiyon aktivatörü (STAT) proteinlerinin aktivasyonu yoluyla gen transkripsiyonunu uyardığı bilinen gp130 sitokin reseptör ailesinin bir üyesidir (OMIM #601007; (Tartaglia 1997)). Leptin reseptörü OB-Rb (uzun reseptör) ve OB-Ra (kısa reseptör) olarak 2 alternatif kırılma (splicing) izoformuna sahiptir (Yiannakouris ve ark. 2001). Biyolojik olarak aktif olanlardan birisi Ob-Rb izoformu sinyal transdüksiyonu kapasitesine sahiptir ve hipotalamusta (nükleus arkuatus) çok fazla eksprese olmaktadır. OB-Ra ise intrasellüler sinyal için gerekli olan segmentlerin tümünü taşımazlar ve bu nedenle sinyal iletiminde rolleri çok az veya yoktur.

OB-Ra reseptörlerinin bulunduğu başlıca dokular böbrek, akciğer, plexus koroideus ve beyin kapıllarlarıdır. Son ikisinde OB-Ra reseptörlerin bol bulunması bunların leptinin merkezi sinir sistemine transportunda önemli görevleri olduğunu düşündürmektedir (Murakami ve ark. 1997; Yamashita ve ark. 1998).

Şekil 2.4. Hipotalamik nöronal alt popülasyonlardaki leptin reseptör sinyali.



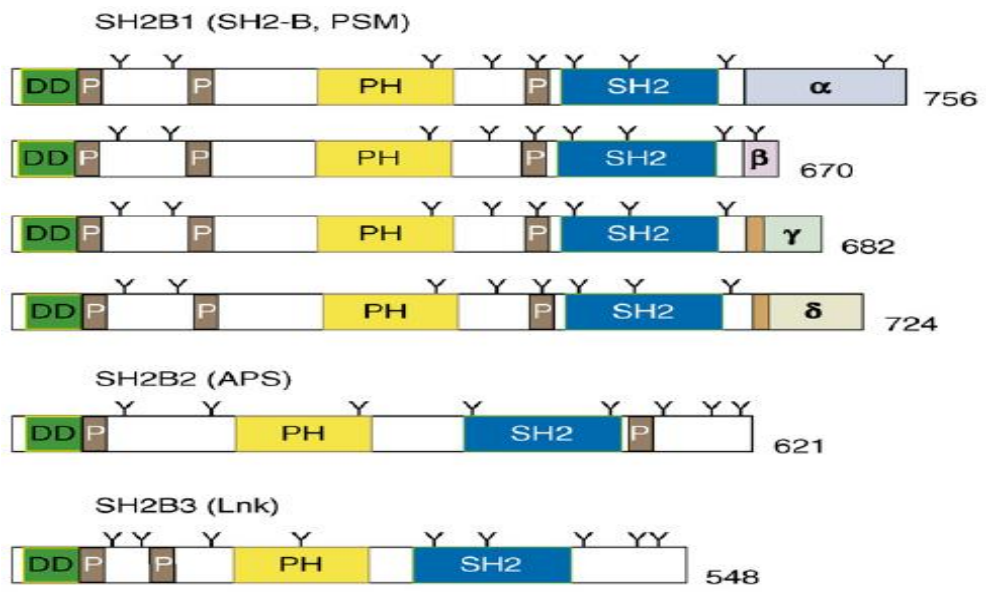
AgRP, Agouti ile ilişkili protein; CART-cocaine-amphetamine-düzenleyici transkript; CRH-corticotropin salan hormon; MC4R, melanocortin- 4 receptor; MCH- melanin yoğunlaştırıcı hormon; α-MSH – α-melanosit uyarıcı hormon; NPY – nöropeptid Y; POMC – pro-opiomelanocortin (Larter ve Chitturi 2010).

Leptin reseptör geninin OBRb formu 70 kb'dır ve 20 exon içerir. Leptin reseptörü (LEPR) protein yapısına göre ekstrasellüler, transmembran ve intrasellüler bölgelerden oluşur. LEPR geninde birkaç fonksiyonel önemli domain bulunmaktadır. Ekstrasellüler bölgede ligand bağlanmasını sağlayan iki sitokin motifi (GXWSXWS) içerir. İntrasellüler bölge hipotalamusta STAT ve Janus-Aktif Kinazla (JAK) etkileşen diziler bulundurur (Matsuoka ve ark. 1997; Schulz ve Widmaier 2004).

## 2.8. SH2B (Src Homology 2 (SH2) B adaptor protein) adaptör protein ailesi ve hücre sinyallenmesi

1979 yılında keşfedilen Src (sarkoma için kısaltılan) geni reseptör olmayan bir tirozin kinaz şifreleyen bir proto-onkogen'dir. SH2B adaptör proteini de insülin reseptörü dahil reseptör ve fosforillenmiş kinazlarla etkileşen SH-domaini içeren bir moleküldür. (Oppermann ve ark. 1979). Fare SH2B geni 9 ekzon içermektedir. SH domainin çekirdeğini şifreleyen ekzon 6-7 kullanılarak 4 splice varyantının (SH2B- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , ve  $\gamma$ ) olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.5) (Nelms ve ark. 1999). SH2B1 (SH2B (PSM)-prolin a.a. bakımından zengin, pleksitrin homolojisi gösteren (PH), SH-domaini içeren sinyal aracı), SH2B2 (APS-Ph, SH2 domaini içerir), SH2B3 (Lnk) SH2B ailesi üyeleridir. Bunların hepsi SH2 domaini, bir PH domaini, birkaç prolinden zengin bölge ve bir dimerizasyon bölgesi içerir (Şekil 2.5) (Maures ve ark. 2007). 16p11.2 lokasyonunda bulunan SH2B1 220 kb'lık delesyonu olan hastalardaki gen dağılımlarından biridir (OMIM #608937, OMIM #613444), (Thorleifsson ve Walters 2009). SH2B1 genini içeren bu kromozomal bölgedeki delesyonların gelişimsel gerilik ve obezite ile bağlantısı gösterilmiştir (Bachmann-Gagescu ve Mefford 2010). Bir meta-analiz çalışmasında FTO ve MC4R dışında 6 yeni bölgenin SH2B1'de VKİ ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Willer ve ark. 2009). SH2B1'in hem erkek hem de dişi farelerde IGF-I aracılı infertilitede kritik bir rol oynadığı da gösterilmiştir (Ohtsuka ve ark. 2002).

Şekil 2.5. SH2B ailesi üyelerinin şematik gösterimi.



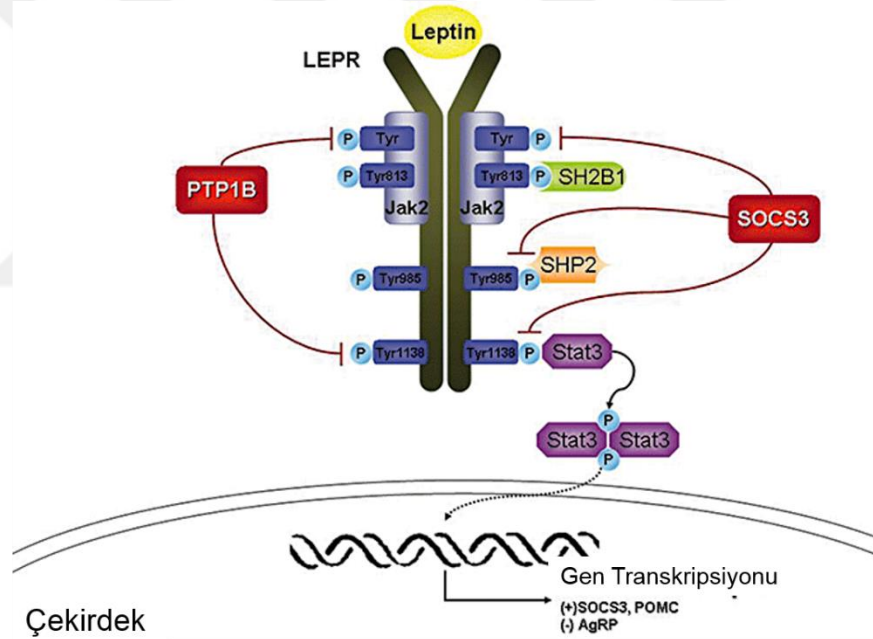
DD-Dimerizasyon Domainsi, PH-Prolinden zengin bölge, Y-Tirozin (Maures ve Kurzer 2007; Rui 2014).



Leptin sinyallenmesi, uzun leptin reseptörü (LepRb) ve JAK/STAT yolağının aktivasyonu ile meydana gelir. (Schulz ve Widmaier 2004; Frühbeck 2006; Li ve ark. 2007). SH2B1 bağımlı veya bağımsız mekanizmalarla JAK2 Tyr813'ün fosforillenmesi ile SH2B1'in SH domainine bağlanarak sinyallenmeyi artırır ve sitoplazmik bir aktivatör-adaptör protein olarak çalışır (Şekil 2.6) (Rui ve Carter-Su 1999; Rui ve ark. 2000; O'Brien ve ark. 2002; Kurzer ve ark. 2006; Li ve Zhou 2007; Maures ve Kurzer 2007; Jiang ve ark. 2008).

SH2B-knockout hayvan çalışmalarıyla leptin sinyal yolağında JAK2 (Janus Aktif Kinaz 2) ile etkileşen SH2B1'in bozulmasıyla hipotalamik NPY ve AgRP'nin ekspresyonunun arttığı gösterilmiş ve leptin direncinin, hiperfaji, obezite ve metabolik sendromla ilişkili olduğu açıklanmıştır (Ren ve Li 2005; Ren ve ark. 2007).

Şekil 2.6. Leptin reseptör sinyal yolağı.

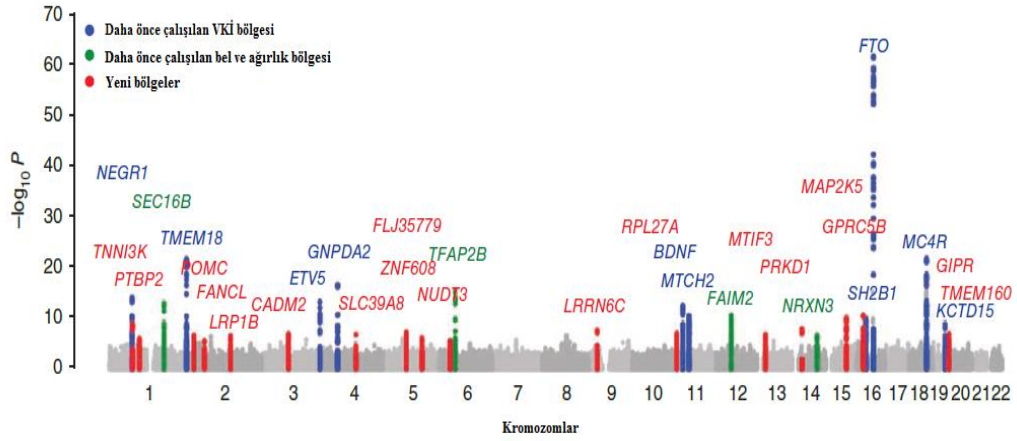


Uzun reseptör LepRb ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için çekirdeğe giren phospho-stat3 dimer (P-stat3) ve Jak2/Stat3 fosforilasyon yolağı ile sinyallenir. SH2 domaini içeren protein 1B (SH2B1) ile sinyal artarken, hücre fosfatazlar (protein fosfatazB1[PTP1B], SH domain fosfataz2 [SHP2] ) ve sitokin sinyal baskılayıcısı SOCS3 ile sinyali azaltacak, uyaracak veya engelleyecektir (Larter ve Chitturi 2010).

Nöronal SH2B1'in N-terminal bölgesi normal vücut ağırlığı ve glukoz metabolizmasının korunması için gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Morris ve Cho 2010).

SH2B1 gen bölgesi 2010 yılında 249,796 kişi üzerinde yapılan bir araştırmada VKİ ile ilgili riskli gen bölgelerinde arasında ve diğer enerji dengesini sağlayan hipotalamik düzenleyicilere yakın bir yerde yer aldığı gösterilmiştir (Şekil 2.7) (Speliotes ve Willer 2010).

Şekil 2.7. VKİ ile ilişkili genlerin meta-analiz sonuçları ve kromozom lokasyonları.



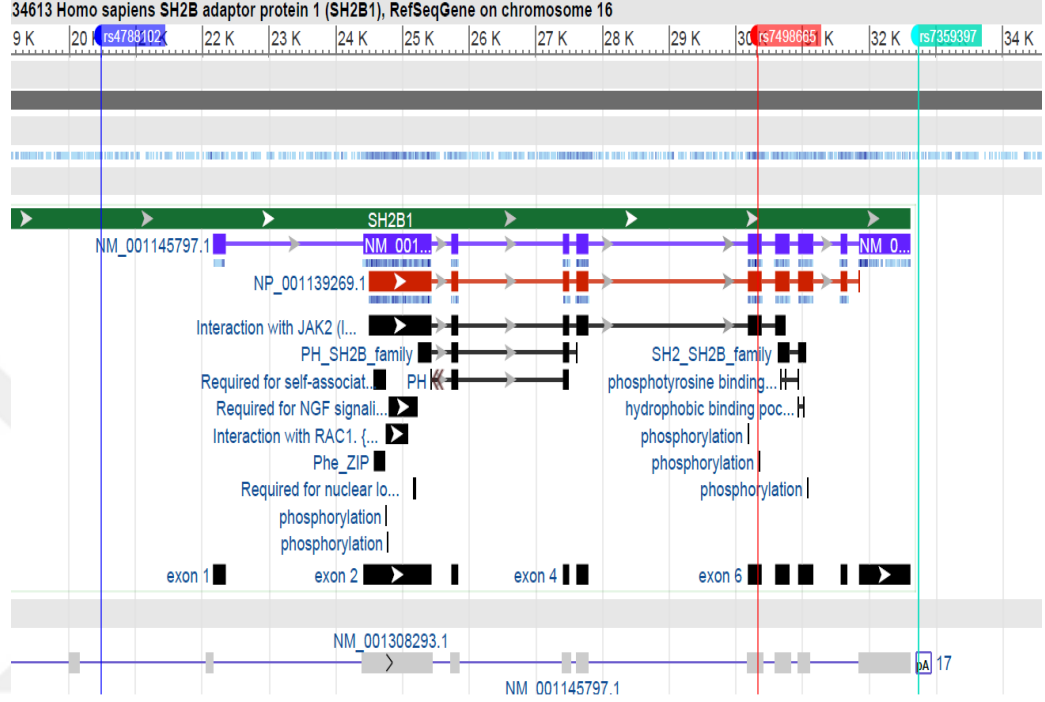
(Speliotes ve ark. 2010).

SH2B1 gen bölgesinde bulunan üç polimorfizmin (rs7498665, rs4788102, rs7359397) meta-analiz veya tekrar çalışmalarında allel sıklığının obezlerde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Bauer ve ark. 2009; Beckers ve ark. 2011; Hotta ve ark. 2011; Volckmar ve ark. 2012).

rs7498665 risk allelinin vücut yağlarının manyetik rezonans (MR) ile ölçüldüğü bir çalışmada yüksek viseral yağ dokusu ve tomografi ile ölçüldüğü çalışmada VKİ ile değil viseral yağ alanı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Haupt ve ark. 2010; Hotta ve Kitamoto 2011). Sandholt ve ark. BDNF rs4923461 risk allelinin tip 2 diabete karşı koruyucu olduğunu ve rs7498665 risk allelinin VKİ'den bağımsız olarak tip 2 diabetes ile ilişkili olduğunu açıklamıştır (Sandholt ve Vestmar 2011; Xi ve ark. 2014). Ayrıca Japon kadınlarda kemik mineral yoğunluğu için rs7498665'in belirleyici olabileceği rapor edilmiştir (Yamada ve ark. 2008). Sağlıklı Kuzey İsveç popülasyonunda rs7498665 ve rs4788102'nin yüksek trigliserit seviyeleri ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Vastermark ve ark. 2012).

Bir diğerk meta-analiz çalışmasında, rs4788102 için sağlıklı kontrolller arasında VKİ'deki değişkenliğin etkisi gözlenirken anormal glukoz hemeostasis ile SH2B1 değişkenliği arasında bir ilişki olmadığı gösterilmiştir (Perez-Iglesias ve ark. 2010; Prudente ve ark. 2013).

şekil 2.8. SH2B1 üzerinde çalışılan varyantların yerleşimi (NCBI 2017).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Popülasyonu

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları kliniği Uyku laboratuvarına 2013-2014 yılları arasında başvuran erkek bireylerden horlama, tanıklı apne ve gündüz aşırı uyku hali şikâyetlerinden en az bir tanesi olanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Oluşturulan çalışma grupları için vücut kitle indekslerine göre 3 grup oluşturuldu. Obezite için sınır değeri  $\geq 30$  ve  $\text{kg/m}^2$  üzeri, normal ya da zayıf için sınır değeri  $\leq 25$   $\text{kg/m}^2$  olarak seçildi (Bayram 2015). Buna göre grup 1 (Obez-Hasta=89 birey), grup 2 (Zayıf-Hasta=71 birey), grup 3 (normal=76 birey) olarak 3 grup oluşturuldu. Bu bireyler poliklinikte uzman doktor tarafından muayene edilerek, boyun ile bel çevresi ve kan basınçları ölçüldü. Gerekli görülenlere resmi prosedür gereği hasta yatışı yapıldı ve rutin biyokimyasal parametreler (hemogram, glukoz, kolesterol, trigliserit, HDL, LDL gibi) ve diğer tahlilleri (EKG, solunum fonksiyon testi, iki yönlü akciğer grafisi) yaptırmaları için yönlendirildi. Yatışı yapılan hastalar akşam saat 9.00'da PSG testi için uzman uyku teknisyenleri tarafından hazırlandı. Yaklaşık 1-1.5 saat arasında süren hazırlıklar sonrası, hastanın sabaha kadar uyku durumu sürekli olarak gözlenerek ortalama 6-8 saat süren standart PSG prosedürüne uygun kayıtları alındı. Alınan kayıtlar sabah uzman doktor tarafından değerlendirilerek tanı konuldu ve hastalığın ağırlık derecesi (AHI' ya göre) belirlendi. Kontrol grubu ise, kliniğe başvuran uyku apnesi tanısı almayan (basit horlama tanısı ile kulak burun boğaz kliniğine yönlendirilen) bireyler ile hastane personeli ve yakın çevreden çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerden oluşturuldu. PSG testi sonrası AHI  $< 5$ 'in altında olan normal bireyler çalışmaya alındı. Bütün bireyler gönüllü olarak ve onam formu (Ek-1) alınarak çalışmaya dahil edildi. Tüm bireyler için genel dışlama kriteri olarak; kardiyovasküler ve serebrovasküler hikaye, diyabet, endokrin hastalıklar, böbrek ve karaciğer hastalığı, santral apne veya Cheyne-Stokes solunum, KOAH (kronik obstrüktif akciğer hastalığı) veya astım, hipertansiyon tedavisi alanlar çalışmaya alınmadı.

### 3.2. DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu Fenol:Kloroform içeren bir prosedür kullanıldı. 10 ml'lik kanlar 50 ml'lik falkon tüplere konuldu. Üzerlerine 0.5 ml 0.5 M EDTA (pH 8,0) eklendi. Bunların üzerine 2X Lysis Buffer (hücre parçalama tamponu) ilavesi ile 50 ml'ye tamamlandı. 10 dakika boyunca tüpler alt üst edilerek iyice karıştırıldı. Daha sonra 30 dakika buzun içinde bekletildi. Buzdan alındıktan sonra 3000 rpm de +4 °C de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerin süpernatant fazı atıldı. Tüplerdeki pellet üzerine 3 ml NaCl/EDTA eklenerek iyice vortekslendi. Daha sonra üzerlerine 0.3 ml %10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) solüsyonu, 150 µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek örnekler 55 °C de 3 saat inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda tüplerin üzerine 3 ml fenol (pH=8) eklendi.

Tüpler 20 saniye oldukça sert bir şekilde çalkalandı ve sonra 5 dakika da yumuşak şekilde ters yüz edildi. Daha sonra tüpler 3000 rpm de +4 °C de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerdeki süpernatant kısmı yeni steril falkon tüplere alındı. Her tüpün üzerine 3 ml Fenol: Kloroform: İzamil Alkol (25:24:1) eklendi. Tüpler 20 saniye oldukça sert bir şekilde çalkalandı ve sonra 5 dakika da yumuşak şekilde ters yüz edildi. Daha sonra tüpler 3000 rpm de +4 °C de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerdeki süpernatant kısmı yeni steril falkon tüplere alındı. Süpernatanın 1/10'u kadar 3M Sodyum Asetat (NaAc) pH=5.2 eklendi. Üzerlerine, alınan süpernatant kısmının 2.5 katı kadar -20 °C de soğutulmuş %95'lik etanol (EtOH) eklendi. Tüpler sert bir şekilde sallanarak çöken DNA'lar cam çubuk ile alındı ve yeni steril 1.5 ml'lik ependorf tüplere konuldu. Pelletler kurutuldu ve alkol uzaklaştırıldı. Daha sonra pellet, 0.5 ml 10 mM Tris (pH=8) ile sulandırıldı.

Sulandırılan stok DNA'lar -20 °C'de saklandı. DNA'ların saflığı ve miktarının belirlenmesi için spektrofotometrik ölçüm yapabilen nanodrop cihazı kullanıldı. Kontaminasyonu önlemek için 0,5 ml stok DNA' dan 0.1 ml' lik 50-100 ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde çalışma stoğu hazırlandı ve tekrar nanodrop cihazında ölçüm yapıldı (Tablo 2.1). 260 nm OD (Optik Dansite) ölçümünün 280 nm OD ölçümüne oranı DNA'da protein ya da RNA kontaminasyonu hakkında bilgi verir (Heaton ve Keer 2008). DNA örneklerinin hepsinde ideal aralık olan 1.8-2 arasında olduğu saptandı. Tablo 3.1'de bazı örneklerimize ait DNA değerleri görülmektedir.

Tablo 3.1. DNA konsantrasyon değerleri.

DNA Örnek No	Oran A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	Stok DNA 0.5 ml (ng/ml)	Sulandırılmış 0.1ml (ng/ml)
5	1.75	531.8	68.8
7	1.85	423.1	79.4
15	1.82	1,012.1	176.1
25	1.75	407.7	94.5
38	1.80	446.8	51.3
46	1.65	469.3	82.6

### 3.3. Taguchi Optimizasyon Metodu

Taguchi metodunun uygulanabilmesi için aşağıdaki prosedürlerin takip edilmesi gerekmektedir.

Taguchi'nin deneysel tasarım adımları;

#### 1. Problemin tanımlanması, değerlendirilecek faktör ve etkileşimlerin seçilmesi:

Bu çalışmada Tetra-ARMS PZR genotipleme yönteminde PZR bileşenlerinin etkin çalışması için uygun konsantrasyon seviyelerinin belirlenmesi;

Etkileşimi önemli öngörülen faktörler: Taq polimeraz, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, Primer-Inner (P-inner), Primer-Outer (P-Outer) olarak belirlenmiştir.

#### 2. Faktör düzeylerinin seçilmesi:

Her bir faktör için 4 farklı seviye de konsantrasyon değeri belirlenmiştir.

#### 3. Performansın değerlendirilmesi için gürültü oranının seçilmesi:

PZR sonrası ürün varlığını görüntülemek için, örnekler agarose jel elektroforeze tabii tutulacaktır. İyi bir ürün varlığında geniş ve daha parlak band profilleri gözlenecektir. Görüntüler seri çekim tekniği ile alınmıştır. Bunun için sabit exposur süresi (60 milisaniye) ve ard arda 10 çekim yapılacaktır. 7'inci ve 8'inci görüntüler değerlendirme de kullanılmıştır. Görüntüleme cihazının (Syngene-Gbox chemi 16) analiz programından (Syngene-Gene Tools ver. 3.08) elde edilen her bir band profili için yükseklik değerleri sonuç çıktısı olarak analizlerde kullanılmıştır. Kalite karakteristiklerinin ölçülmesinde ve değerlendirilmesinde kullanılan ölçüt, ölçülmek istenen sinyalin (S), gürültü faktörüne (N) oranı şeklinde yorumlanacaktır.

Sinyal değeri sistemin verdiği ve ölçülmek istenen gerçek değeri, gürültü faktörü ise ölçülen değer içerisindeki istenmeyen faktörlerin payını temsil eder. Buna göre sinyal/gürültü oranı için “*en büyük en iyi*” gürültü oranı seçilmiştir.

4. Uygun ortogonal düzenin seçilmesi:

Probleme uygun ortogonal dizinler serbestlik derecelerine göre belirlenir. Her faktörün serbestlik derecesi faktör seviye sayısının bir eksigidir. Buna göre 5 faktörün 4 seviyeli serbestlik derecesi toplamı 15 olacaktır. En küçük ortogonal tasarım  $L_{16} (4^5)$  olacaktır.

5. Faktör veya etkileşimlerin kolonlara atanması: (Tablo 3)

6. Testlerin yapılması:  $L_{16} (4^5)$  ortogonal tasarımında 16 reaksiyon için standardize edilmiş koşullarda PZR çalışması yürütülmüştür. Bu 16 reaksiyon aynı gün içinde 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

7. Sonuçların analiz edilmesi:

Elde edilen 3 tekrarlı sonuçların beklenen band profil değerlerinin ortalaması alınarak Minitab istatistik programında analiz edilmiştir. Deney analizi sonucu “*en yüksek en iyi*” sinyal gürültü oranı için S/N ve ortalama değerlerine göre optimum seviyeler belirlendi. Öngörülen değer (*Predicted value*) [öngörülen S/N oranı ve ortalama değer] optimum değerlere göre hesaplandı.

8. Doğrulama deneylerinin yapılması:

Minitab çıktısından elde edilen optimum ayarlar kullanılarak tekrar PZR çalışması yapıldı ve bulunan sonuçlar band profillerine göre değerlendirildi.

Sonuçların analizi ve doğrulama deneyleri her bir bölge için ayrı ayrı yapılmıştır.



Aşağıdaki Tablo 3.2’de PZR bileşenlerinin stok konsantrasyonları ve 1. seviyede referans konsantrasyonları parantez içinde gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Optimizasyonu için Taguchi analizinde kullanılan PZR bileşenlerinin konsantrasyon seviyeleri (parantez içi).

		Faktörler				
		A-Taq (5 U/μl)	B-MgCl <sub>2</sub> (25mM)	C-dNTP (10mM)	D-Primer-İnners (100pmol/μl)	E-Primer-Outer (100pmol/μl)
Konsantrasyon Seviyeleri (μl)	1	0.2 (0.04U/μl)	2.5 (2.5mM)	0.5 (5mM)	0.25 (1pmol/μl)	0.25(1pmol/μl)
	2	0.3	3	0.9	0.5	0.5
	3	0.4	3.5	1.25	1	1
	4	0.5	4	1.5	2	2

Aşağıdaki Tablo 3.3’de kodlanmış konsantrasyon seviyelerinin L16 ortogonal tasarıma göre yerleşimini göstermektedir.

Tablo 3.3. Her biri 4 seviyede olan faktörler için kodlanmış ortogonal tasarım düzeni.

Reaksiyon Sıra No	A-Taq	B-MgCl <sub>2</sub>	C-dNTP	D-Primer-İnner	E-Primer-Outer
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4
5	2	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

Aşağıdaki Tablo 3.4’de L16 ortogonal tasarıma göre konsantrasyon seviyeleri  $\mu\text{l}$  olarak gösterilmiştir. PZR reaksiyonları toplam 25  $\mu\text{l}$  hacimde 1X Buffer 2.5  $\mu\text{l}$ , DNA 2  $\mu\text{l}$  (50-100 ng/ $\mu\text{l}$ ) eklendi. Değerler  $\mu\text{l}$  olarak ifade edilmiştir.

Tablo 3.4. Ortogonal tasarım için konsantrasyon göstergeleri.

Reaksiyon Sıra No	A-Taq	B-MgCl <sub>2</sub>	C-dNTP	D-Primer- Inner	E-Primer- Outer	dH <sub>2</sub> O
1	0.2	2.5	0.5	0.25	0.25	19.3
2	0.3	3	0.9	0.25	0.5	17.3
3	0.4	3.5	1.25	0.25	1	15.35
4	0.5	4	1.5	0.25	2	12.5
5	0.3	3.5	1.5	0.5	0.25	16.2
6	0.2	4	1.25	0.5	0.5	15.55
7	0.5	2.5	0.9	0.5	1	16.1
8	0.4	3	0.5	0.5	2	14.1
9	0.4	4	0.9	1	0.25	15.2
10	0.5	3.5	0.5	1	0.5	15.5
11	0.2	3	1.5	1	1	14.3
12	0.3	2.5	1.25	1	2	12.95
13	0.5	3	1.25	2	0.25	13.75
14	0.4	2.5	1.5	2	0.5	13.6
15	0.3	4	0.5	2	1	12.2
16	0.2	3.5	0.9	2	2	10.4

### 3.4. Genotipleme (Tetra-ARMS PZR ve RFLP)

Tetra-ARMS PZR’a ait primerler online olarak (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) tasarlanmıştır. Tetra-ARMS PZR her bir bölge için ayrı ayrı çalışıldı. Primerler Biomatik (Kanada) firmasına sentez ettirildi. PZR bileşenleri için Solis Byodyne markalı ürünler (<https://www.sbd.ee/>) kullanıldı. Seçilen örnekler ABI 3730XL automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) ile dizileme yöntemine tabi tutularak sonuçlar değerlendirildi. Jel görüntüleri için Syngene marka GBOX jel görüntüleme cihazı ve GeneSnap ( versiyon 7.02) yazılımı kullanıldı. Jelde görüntülenen fragmentlere ait pik değerleri aynı markaya ait GeneTools (versiyon. 3.08) yazılımı kullanılarak elde edildi.

3.4.1. rs7498665 (NM\_001145795.1: c.1450 A>G; p. T484A)

PZR basamakları ilk denatürasyon basamağı 94 °C 8 dk, 30 döngü 94 °C 30 sn-62.3 °C 30 sn-72 °C 40 sn, son uzama basamağı 72 °C 10 dk olarak optimize edilmiştir.

Tetra-ARMS PZR yöntemine ait primer ürünleri ileri (forward) dış-geri (reverse) dış primerler 608 baz çifti (bç) uzunluğunda ortak ürün oluşturmuştur. Normal allele (A) ait ileri dış-geri iç primer ürünü 258 bç ve Mutant allele (G) ait ileri iç-geri dış primer ürünü 395 bç olarak amplifiye edilmiştir.

PZR reaksiyonu için aşağıdaki çizelge de bulunan PZR bileşenleri belirlenen yoğunlukta ve hacimlerde 25 µl' lik bir reaksiyon için hesaplandı ve uygulandı. Ayrıca her bir reaksiyonda primerlerin stabilitesini koruması için toplam reaksiyon hacminin %5'ini geçmeyecek şekilde %88 saflıkta moleküler grade olan gliserol eklenmiştir.

Tablo 3.5. Tetra-ARMS için kullanılan primerler (rs7498665).

Primer adı	Primer Dizisi	%GC	T <sub>m</sub> °C
İleri iç primer (G allele)	CCCCATTGAAGAGGGACCCC <u>AAG</u>	60.87	69.87
Geri iç primer (A allele)	GAGAGGGGATGAACTGTCCC <u>GGT</u>	60.87	70.66
İleri dış primer	CACACAGGGTAGACTGCTGGTGAGG	60.00	71.06
Geri dış primer	TGTGCAGCCTTGAGCCGAGAGAG	60.87	70.33
PZR Annealing Sıcaklığı	62.3 °C		
Ortak ürün	FO-RO	608bç	
A allele (Normal)	FO-Ri	258bç	
G allele (Mutant)	Fi-RO	395bç	

RFLP için kullanılan primerler ve özellikleri;

Tablo 3.6. PZR-RFLP Primer ve enzim özellikleri (rs7498665).

rs7498665	Primer Dizisi 5'→3'	%GC/T <sub>m</sub> °C	PZR Ürün Boyutu	RE ve Tanıma dizisi
Forward	GGGTAGACTGCTGGTGAGGA	60.00/65.73	501 bç	BseYI
Reverse	CCCTTCAGGAAGGAGAGAGG	60.00/63.92		C <sup>^</sup> CCAGC

### 3.4.2. rs4788102 (NM\_001145795.1: c.-1952G>A)

PZR basamakları ilk denatürasyon basamağı 94 °C 8 dk, 30 döngü 94 °C 30 sn- 62.3 °C 30 sn- 72 °C 40 sn, son uzama basamağı 72 °C 10 dk olarak optimize edilmiştir.

Tetra-ARMS PZR yöntemine ait primer ürünleri ileri dış-geri dış primerler 264 baz çifti (bç) uzunluğunda ortak ürün oluşturmuştur. Normal allele (G) ait ileri iç-geri dış primer ürünü 127 bç ve mutant allele (A) ait ileri dış-geri iç primer ürünü 193 bç olarak amplifiye edilmiştir.

PZR reaksiyonu için aşağıdaki çizelgede bulunan PZR bileşenleri belirlenen yoğunlukta ve hacimlerde 25 µl' lik bir reaksiyon için hesaplandı ve uygulandı. Ayrıca her bir reaksiyon da primerlerin stabilitesini koruması için toplam reaksiyon hacminin %5 ini geçmeyecek şekilde %88 saflıkta moleküler grade olarak gliserol eklenmiştir.

Tablo 3.7. Tetra-ARMS için kullanılan primerler (rs4788102).

rs4788102	Primer Dizisi	%GC	Tm
Forward inner (A Allele)	TCTGAATCTGTCCGCTCTGGACTTTACA	46.43	69.82
Reverse inner (G Allele)	CAGTAAAGGAAGCTATGGCCCAAGTAGTC	48.28	69.01
Forward outer (FO)	GCATAGGGAAGGCAGAACCAGAGAT	52.00	68.57
Reverse outer (RO)	CTGGAGCTAAGAAGAGACATCAAGGC	50.00	67.27
PZR Annealing Sıcaklığı	62.3 °C		
Ortak ürün	FO-RO	( 264 bç )	
G allel (Normal)	FO- Ri	( 127 bç )	
A allel (Mutant)	Fi-RO	( 193 bç )	

RFLP için kullanılan primerler ve özellikleri;

Tablo 3.8. PZR-RFLP Primer ve enzim özellikleri (rs4788102).

rs4788102	Primer Dizisi 5'→3'	%GC/Tm °C	PZR Ürün Boyutu	RE ve Tanıma dizisi
Forward	TGCCACTAAGAGAGGAGAGC	55.00/63.26	350 bp	TaqI T <sup>^</sup> CGA
Reverse	GGTCAATTCCAGACGTGCTT	50.00/63.45		

### 3.4.3. rs7359397 (NM\_001145795.1: c.\*518C>T)

PZR basamakları ilk denatürasyon basamağı 94 °C 8 dk, 30 döngü 94 °C 30 sn- 62.3 °C 30 sn- 72 °C 40 sn, son uzama basamağı 72 °C 10 dk olarak optimize edilmiştir.

Tetra-ARMS PZR yöntemine ait primer ürünleri ileri dış-geri dış primerler 545 baz çifti (bç) uzunluğunda ortak ürün oluşturdu. Normal allele (C) ait ileri iç-geri dış primer ürünü 186 bç ve mutant allele (T) ait ileri dış-geri iç primer ürünü 411 bç olarak çoğaltıldı.

PZR reaksiyonu için aşağıdaki çizelgede bulunan PZR bileşenleri belirlenen yoğunlukta ve hacimlerde 25 µl' lik bir reaksiyon için hesaplandı ve uygulandı. Ayrıca her bir reaksiyon da primerlerin stabilitesini koruması için toplam reaksiyon hacminin %5 ini geçmeyecek şekilde %88 saflıkta moleküler grade olarak gliserol eklenmiştir.

Tablo 3.9. Tetra-ARMS için kullanılan primerler (rs7359397).

rs7359397_ARMS	Primer Dizisi	%GC	Tm (°C)
Forward inner (C allele)	CCATCATTCTGCAGTGCTGTGCTGTC	53.85	70.38
Reverse inner (T allele)	AGGCTGTCAGACACAGGGATGGCTACA	55.56	73.18
Forward outer (FO)	TACAAGCAGAGGCTCGGGAGAG	59.09	68.02
Reverse outer 2_1(RO)	CCAGCTCTCTCTAGGGTACAAAGCCA	53.85	69.71
PZR Annealing Sıcaklığı	65.5 °C		
Ortak ürün	FO-RO		( 545 bp )
C allele (Normal)	Fi-RO		( 186 bp )
T allele (Mutant)	FO- Ri		( 411 bp )

RFLP için kullanılan primerler ve özellikleri;

Tablo 3.10. PZR-RFLP primer ve enzim özellikleri (rs7359397).

rs7359397	Primer Dizisi 5'→3'	%GC/Tm °C	PZR Ürün Boyutu	RE ve Tanıma dizisi
Forward	ATTGTTTGCTGTGGGGACTG	50.00/63.71	317 bp	Hpy188I TCN^GA
Reverse	CAATCTCTCCAGCACAGCC	55.00/63.56		

### 3.5. İstatistiksel analizler

Çalışmada elde edilen veriler istatistik olarak normal dağılım ve varyans denkliği açısından incelendi. Normal olmayan ve varyansları denk görülmeyen sonuçlar median-ortanca- (minimum-maksimum) değer olarak ifade edildi. Parametrik olmayan 3 veya daha fazla grubun karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi, ikili grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi uygulandı. Normal dağılım ve varyans uygunluğu sağlayan parametrik verilerde en az 3 grup için ANOVA ve ikili karşılaştırmalar için Post-Hoc testler kullanıldı. Kategorik değişkenler ve genotip sıklıklarını karşılaştırmak için Ki-Kare ve Fisher's Exact testi kullanıldı.

### 3.6. Etik Kurul ve Proje Onayı

Necmettin Erbakan Üniversitesi (N.E.Ü.) Meram Tıp Fakültesi Etik Kurul Komisyonu tarafından "Obezite ile ilişkili SH2B1 gen varyantlarının uyku apnesi ile bağlantı potansiyelinin belirlenmesi" başlıklı doktora tez çalışması 07 Mart 2014 ve 2014/611 sayılı karar ile onaylanmıştır. N.E.Ü. BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri) komisyonu tarafından da 141418002 proje numarası ile desteklenmiştir.

## 4. BULGULAR

Çalışmaya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Uyku Laboratuvarına 2013-2014 yılları arasında kliniğe başvuran toplam 236 erkek (obez-hasta n=89, zayıf-hasta n=71, kontrol n=76) birey çalışmaya alınmıştır. Sonuçların analizinde bütün bireyler dahil edilerek ve ayrıca alt gruplara göre klinik veriler ve genotip sıklıkları karşılaştırılmıştır. Her bir varyant için elde edilen genotipler ile klinik veriler analiz edilmiştir.

### 4.1. Taguchi Optimizasyonu

$L_{16}(4^5)$  ortogonal deney tasarımına göre her bölge için her bir reaksiyondan elde edilen fragment yanıtlarının ortalama pik değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Analizler tablodaki değerlere göre yapılmıştır. Herhangi bir fragment elde edilemeyen reaksiyonlar için tabloda hesaplama yapılabilmesi için değeri 1 olarak girilmiştir (Tablo 4.1). Jel görüntüleri için Syngene GBOX jel görüntüleme cihazı ve GeneSnap ( Sürüm 7.02) yazılımı kullanılmıştır. Jelde görüntülenen fragmentlere ait pik değerleri aynı markaya ait GeneTools (Sürüm 3.08) yazılımı kullanılarak elde edilmiştir.

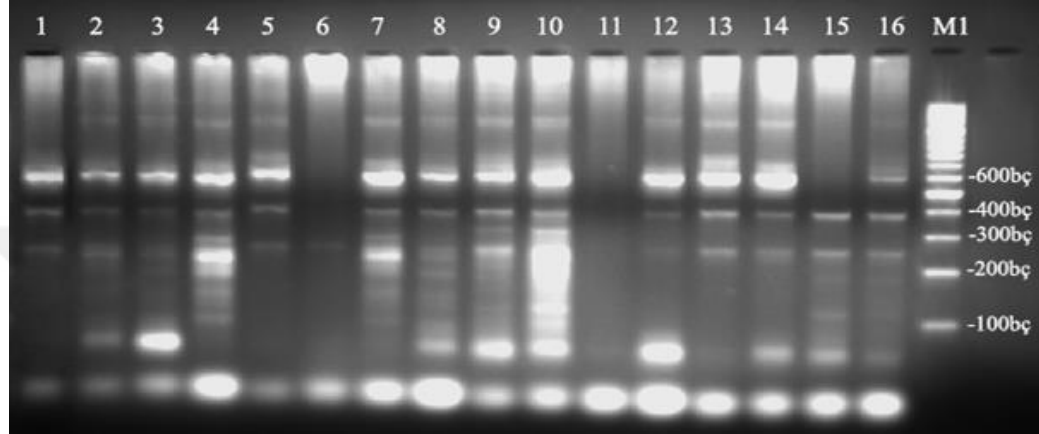
Tablo 4.1. Taguchi deney tasarımına göre yapılan PZR sonuçlarına ait pikler

Reaksiyon Sıra No	Sonuç		
	rs7498665	rs4788102	rs7359397
1	12,420.1	29,664.2	1
2	9,255.9	16,709.9	2,946.3
3	8,798.6	28,575.2	14,992.2
4	16,341.0	23,105.6	1,712.7
5	11,820.9	22,538.7	1
6	1	22,887.9	1
7	15,584.2	24,210.9	1
8	8,973.0	23,718.5	18,100.6
9	13,090.3	13,646.3	1
10	13303.0	8,941.3	1
11	1	21,616.7	18,299.1
12	10,945.6	20,025.6	15,895.7
13	13,536.4	19,400.8	1
14	11,686.0	21,557.0	1
15	7,196.3	22,636.7	24,504.7
16	6,821.5	20,352.0	11,387.4

#### 4.1.1. rs7498665

rs7498665 polimorfizmine ait ortogonal tasarıma göre PZR reaksiyonları yapılmıştır. PZR sonuçlarına göre görüntüleme cihazından ve yazılımından elde edilen verilere (Tablo 4.1) Taguchi analizi uygulanmıştır. Optimizasyon jel görüntüsü aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.1).

Şekil 4.1. Ortogonal tasarıma göre uygulanmış rs7498665-PZR sonuçları.



M1: 100 bç marker. 1-16 ortogonal tasarım reaksiyonları

Taguchi analizinden elde edilen S/N gürültü oranları (Tablo 4.2) ve ortalamalar (Tablo 4.3) için yanıt tabloları aşağıdadır. Tablolardaki önem derecesi her faktör için en büyük ve en küçük değerlerin farkının alınması ve büyükten küçüğe doğru sıralanmasıdır.

Tablo 4.2. rs7498665'e ait S/N oranları için yanıt tablosu.

Seviyeler	Taq	MgCl2	dNTP	P-inner	P-outer
1	81.09	82.08	39.64	81.97	80.14
2	61.09	60.79	79.68	60.25	80.55
3	61.40	59.97	80.41	79.87	60.58
4	79.45	80.20	83.31	60.94	61.77
Önem Derecesi	20	22.11	43.67	21.71	19.97
	4	2	1	3	5

Tablo 4.3. rs7498665'e ait ortalamalar için yanıt tablosu.

Seviyeler	Taq	MgCl2	dNTP	P-inner	P-outer
1	1,1704	1,2717	4,811	12,659	10,473
2	9,095	8,561	9,805	7,942	11,188
3	9,335	7,895	10,637	10,186	83,20
4	9,810	10,770	14,691	9,157	9,962
Önem Derecesi	2,609	4,822	9,880	4,717	2,868
	5	2	1	3	4

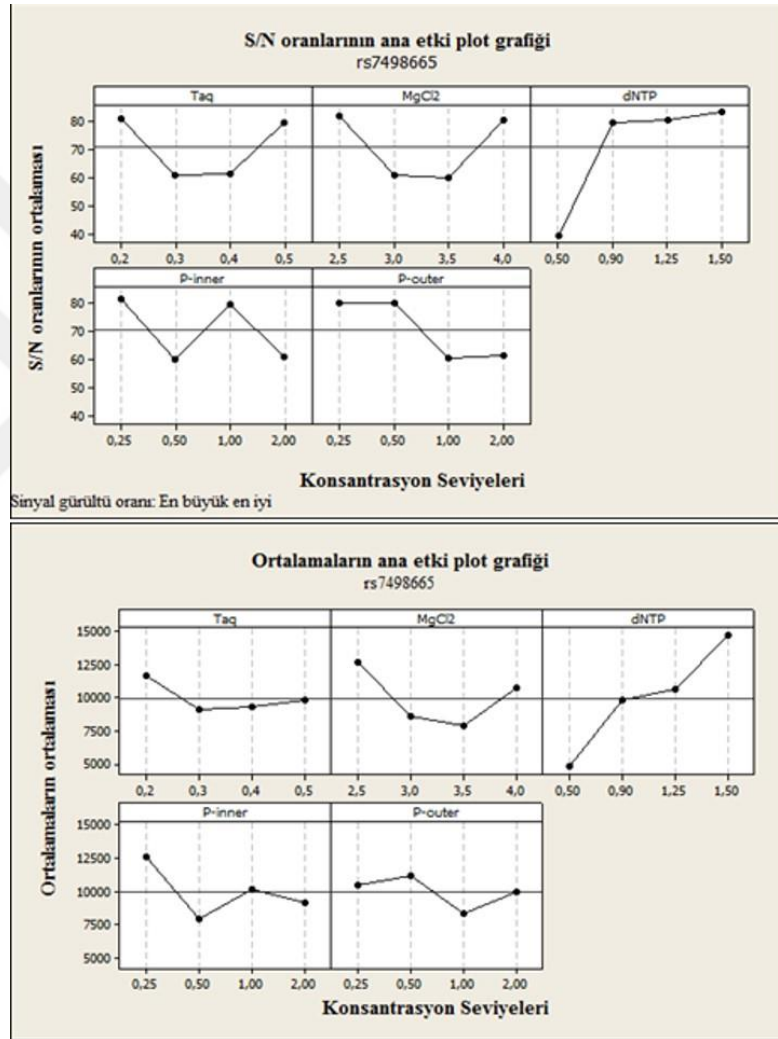


Aşağıdaki tabloda rs7498665 için analizlerden elde edilen tahmini değerler (predicted value) gösterilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. rs7498665' e ait S/N oranı, ortalama ve faktör seviyeleri için tahmin edilen değerler.

rs7498665	Taq	MgCl <sub>2</sub>	dNTP	P-inner	P-outer
S/N Oranı					
125.96					
Ortalama	1	1	4	1	2
23,015.2					

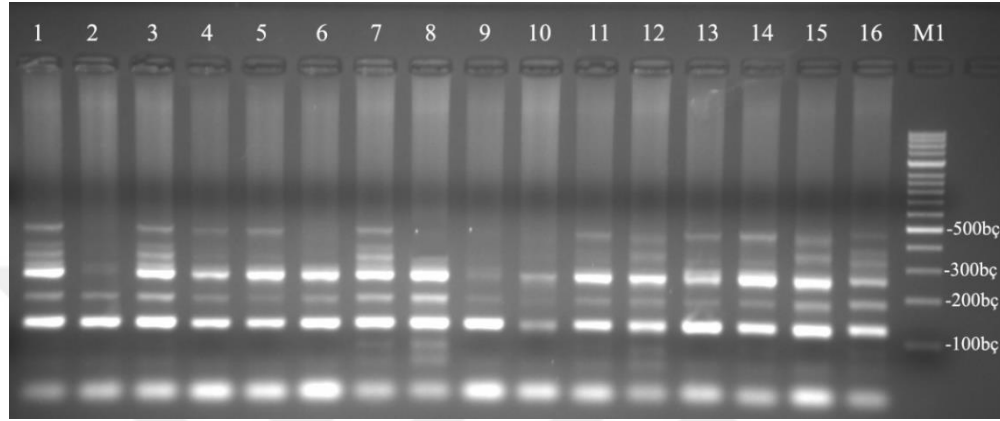
Şekil 4.2. rs7498665 Taguchi Plot Grafiği.



#### 4.1.2. rs4788102

rs4788102 polimorfizmine ait ortogonal tasarıma göre PZR reaksiyonları yapılmıştır. PZR sonuçlarına göre görüntüleme cihazından ve yazılımından elde edilen verilere (Tablo 4.1) Taguchi analizi uygulanmıştır. Optimizasyon jel görüntüsü aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.3).

Şekil 4.3. Ortogonal tasarıma göre uygulanmış rs4788102-PZR sonuçları.



M1: 100 bç. 1-16 ortogonal tasarım reaksiyonları.

Taguchi analizinden elde edilen S/N gürültü oranları (Tablo 4.5) ve ortalamalar (Tablo 4.6) için yanıt tabloları aşağıdadır.

Tablo 4.5. rs4788102'e ait sinyal gürültü oranları için yanıt tablosu.

Seviyeler	Taq	MgCl <sub>2</sub>	dNTP	P-inner	P-outer
1	87.57	86.24	87.38	87.46	85.77
2	87.36	84.34	86.16	86.10	85.25
3	83.61	87.65	86.50	85.34	87.03
4	86.42	86.74	84.93	86.07	86.93
Önem Derecesi	3.96	3.31	2.44	2.11	1.77
	1	2	3	4	5

Tablo 4.6. rs4788102'e ait ortalamalar yanıt tablosu.

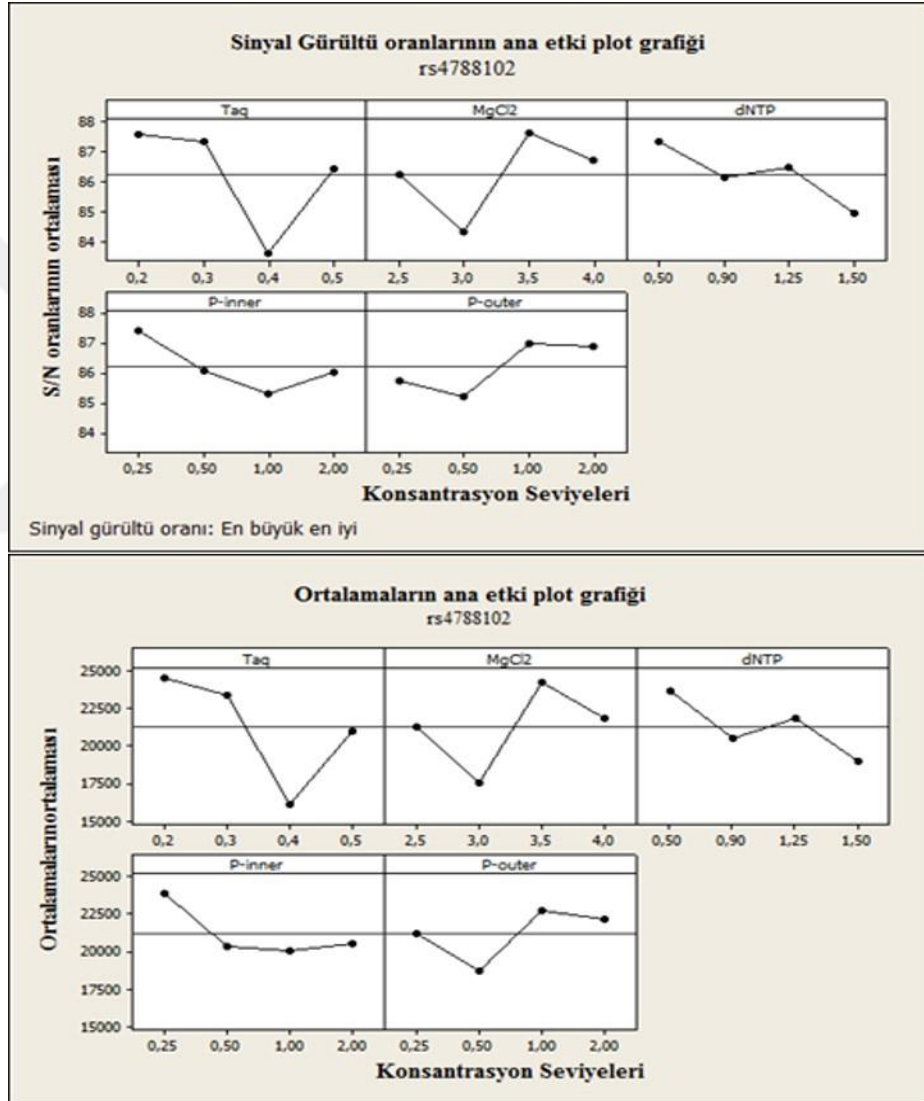
Seviyeler	Taq	MgCl <sub>2</sub>	dNTP	P-inner	P-outer
1	24,514	21,313	23,630	23,864	21,240
2	16,057	24,260	21,874	20,102	22,722
3	23,339	17,524	20,478	20,361	18,730
4	20,987	21,800	18,915	20,569	22,205
Önem Derecesi	8,456	6,736	4,716	3,763	3,993
	1	2	3	5	4

Aşağıdaki Tablo 4.7’de rs4788102 için analizlerden elde edilen tahmini değerler (predicted value) gösterilmiştir.

Tablo 4.7. rs4788102’ e ait S/N oranı, ortalama ve faktör seviyeleri için tahmin edilen değerler.

rs4788102	Taq	MgCl2	dNTP	P-inner	P-outer
S/N Ratio					
92.11					
Mean	1	3	1	1	3
34,093.8					

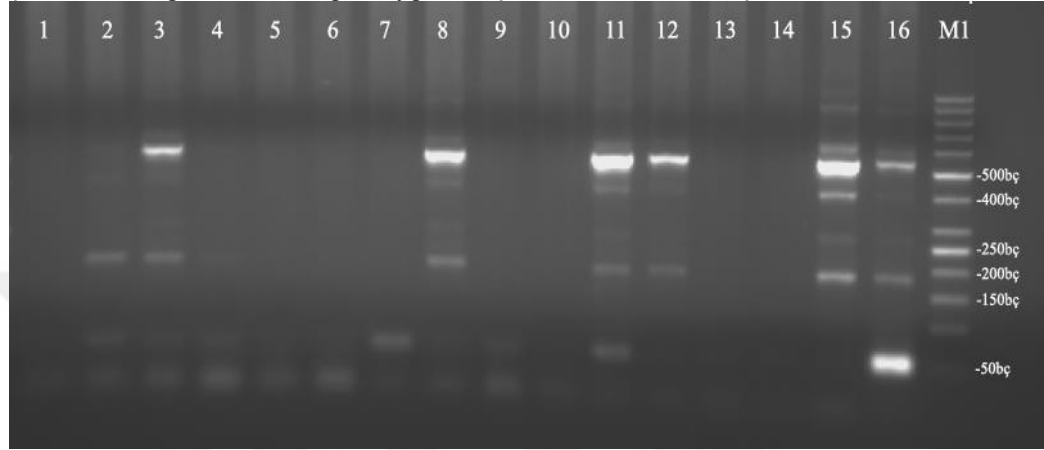
Şekil 4.4. rs4788102 Taguchi Plot Grafiği



#### 4.1.3. rs7359397

rs7359397 polimorfizmine ait ortogonal tasarıma göre PZR reaksiyonları yapılmıştır. PZR sonuçlarına göre görüntüleme cihazından ve yazılımından elde edilen verilere (Tablo 4.1) Taguchi analizi uygulanmıştır. Optimizasyon jel görüntüsü aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.5).

Şekil 4.5. Ortogonal tasarıma göre uygulanmış rs7359397-PZR sonuçları.



M1: 100 bç; 1-16 ortogonal tasarım reaksiyonları.

Taguchi analizinden elde edilen S/N gürültü oranları (Tablo 4.8) ve ortalamalar (Tablo 4.9) için yanıt tabloları aşağıdadır.

Tablo 4.8. rs7359397' e ait S/N oranı yanıt tablosu.

Seviyeler	Taq	MgCl2	dNTP	P-inner	P-outer
1	54.39	0	41.59	21.01	43.23
2	21.29	17.35	60.30	59.95	37.63
3	42.32	64.14	42.17	41.16	41.89
4	42.23	78.75	16.17	38.11	37.48
Önem Derecesi	33.11	78.75	44.13	38.94	5.75
	4	1	2	3	5

Tablo 4.9. rs7359397' e ait ortalamalar yanıt tablosu.

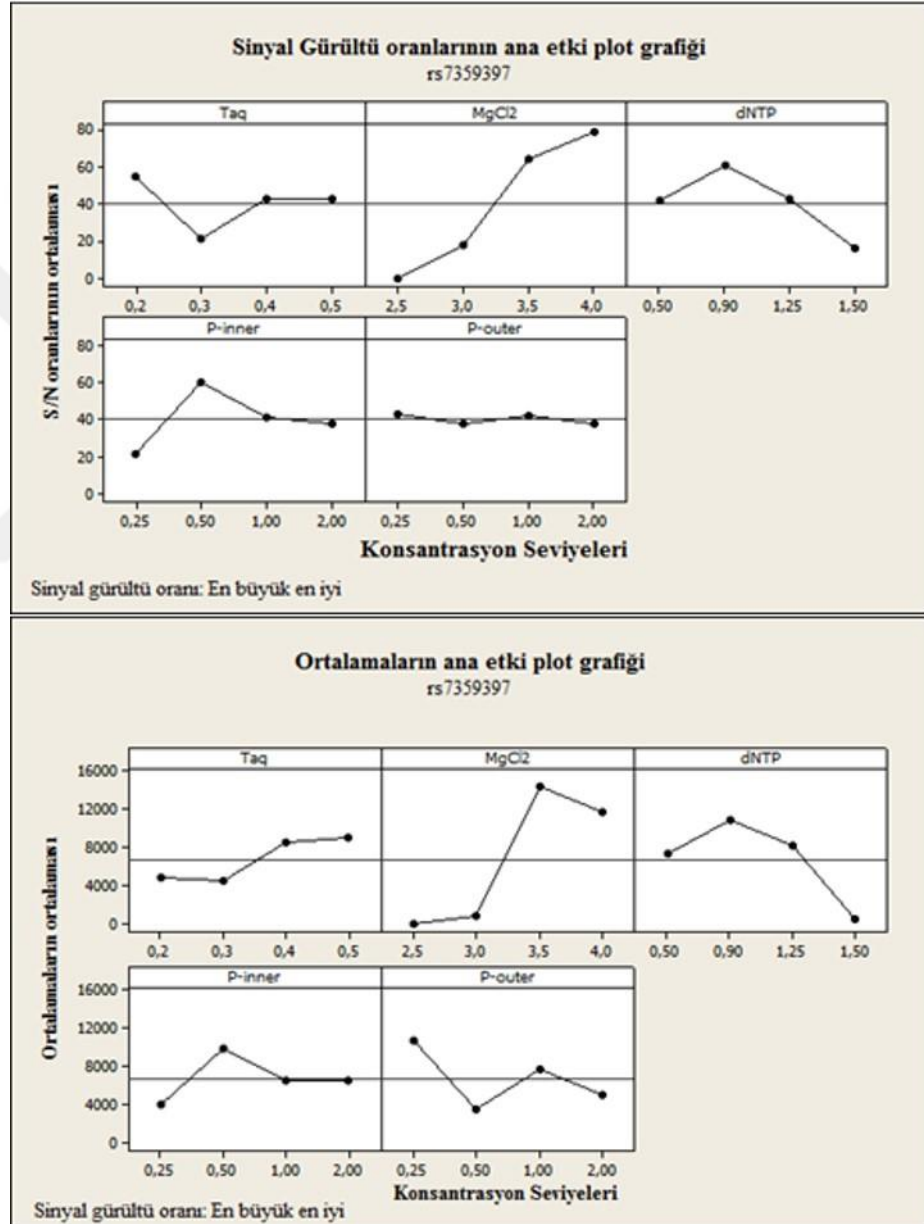
Seviyeler	Taq	MgCl2	dNTP	P-inner	P-outer
1	4,913.1	1	7,422.1	3,974.7	10,651.8
2	4,525.9	737.3	10,836.9	9,836.8	3,583.9
3	8,549.2	14,449.2	8,273.7	6,595.4	7,722.5
4	8,973.5	11,774.1	428.9	6,554.8	5,003.4
Önem Derecesi	5	1	2	4	3

Aşağıdaki Tablo 4.10'da rs7359397 için analizlerden elde edilen tahmini değerler (predicted value) gösterilmiştir.

Tablo 4.10. rs7359397' e ait S/N oranı, ortalama ve faktör seviyeleri için tahmin edilen değerler.

rs7359397	Taq	MgCl2	dNTP	P-inner	P-outer
S/N Oranı 136.39	1	4	2	2	1
Ortalama 21,051	4	3	2	2	1

Şekil 4.6. rs7359397 Taguchi Plot Grafiği.

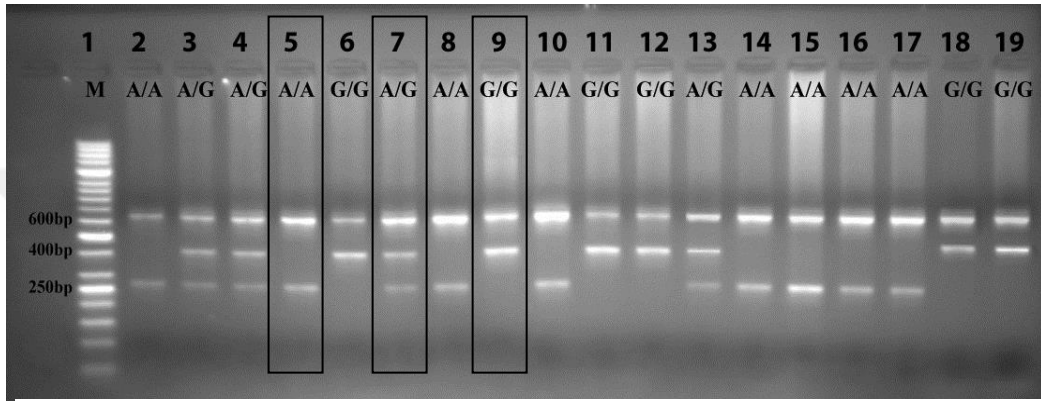


#### 4.2. Tetra-ARMS PZR, RFLP ve Dizi Analizi

##### 4.2.1. rs7498665 (c.1450 A>G; p. T484A)

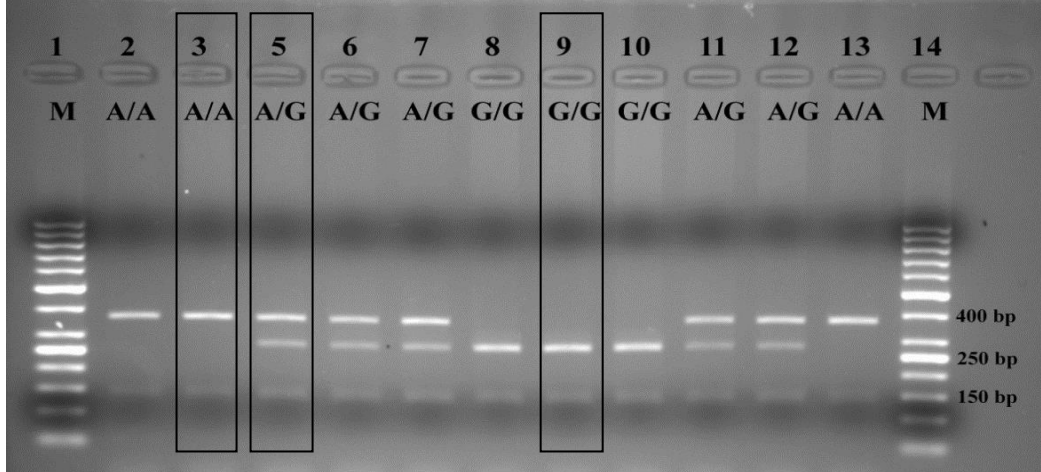
Aşağıdaki Şekil 4.7 Taguchi analizinden sonra belirlenen optimum seviyelerdeki Tetra-ARMS PZR sonuçlarını göstermektedir. İşaretli örnekler farklı bireylere ait homozigot normal (H13), heterozigot (H20), homozigot mutant (H28) genotipleri göstermektedir.

Şekil 4.7. rs7498665 Tetra-ARMS PZR jel görüntüsü.



5: H13, 7:H20, 9:H28

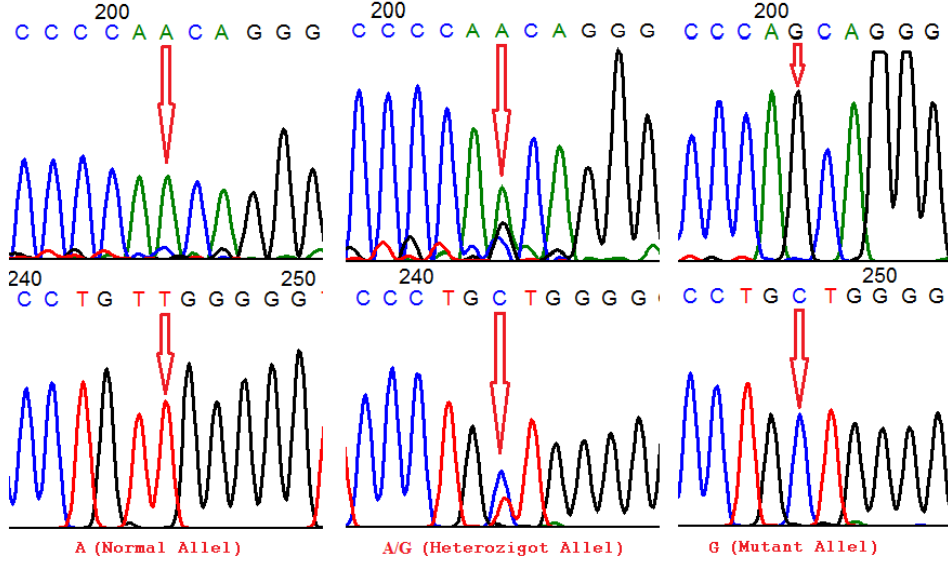
Şekil 4.8. rs7498665 RFLP sonuçları.



M: 50 bç, 3:H13, 5:H20, 9: H28.

Aşağıdaki Şekil 4.9, genotipleri belirlenen bireylerin dizi analizi sonuçlarını göstermektedir. Alleller kırmızı oklar ile işaretlenmiştir. Buna göre pozitif iplik (üst) sırayla CAAC homozigot normal alleli, CAA/GC heterozigot alleli, CAGC mutant allel dizisini göstermektedir.

Şekil 4.9. rs7498665'e ait dizi analiz sonuçları.

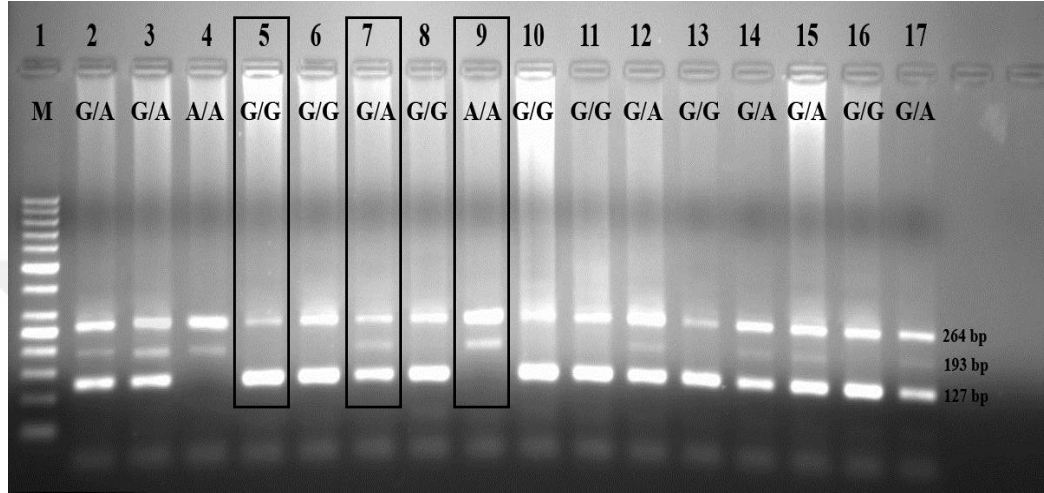


3:H13, 5:H20, 9: H28

#### 4.2.2. *rs4788102 (c.-1952 G>A)*

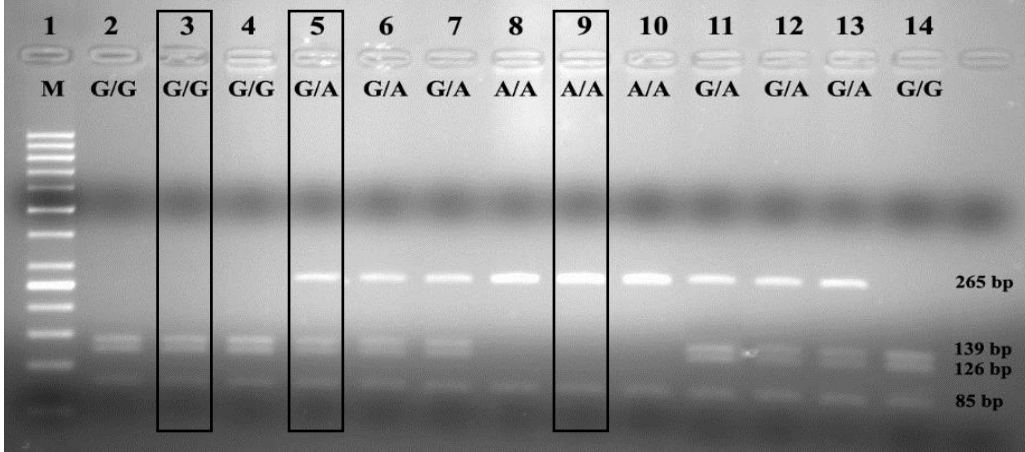
Aşağıdaki Şekil 4.10, Taguchi analizinden sonra belirlenen optimum seviyelerdeki Tetra-ARMS PZR sonuçlarını göstermektedir. İşaretli örnekler farklı bireylere ait homozigot normal (H13), heterozigot (H20), homozigot mutant (H28) genotipleri göstermektedir.

Şekil 4.10. *rs4788102* Tetra-ARMS PZR jel görüntüsü.



5: H13, 7:H20, 9:H28

Şekil 4.11. *rs4788102* PZR-RFLP jel görüntüsü.

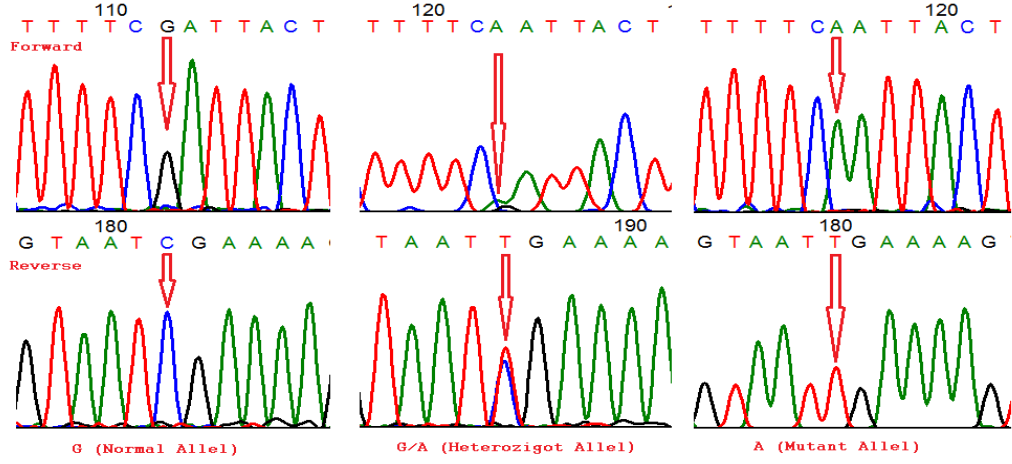


M:50 bç, 3: H13, 5:H20, 9:H28



Aşağıdaki Şekil 4.12, genotipleri belirlenen bireylerin dizi analizi sonuçlarını göstermektedir. Alleller kırmızı oklar ile işaretlenmiştir. Buna göre pozitif iplik (üst) sırayla TCGA homozigot normal alleli, CAG/AC heterozigot alleli, CAAC mutant allel dizisini göstermektedir.

Şekil 4.12. rs4788102 dizi analizi sonucu.

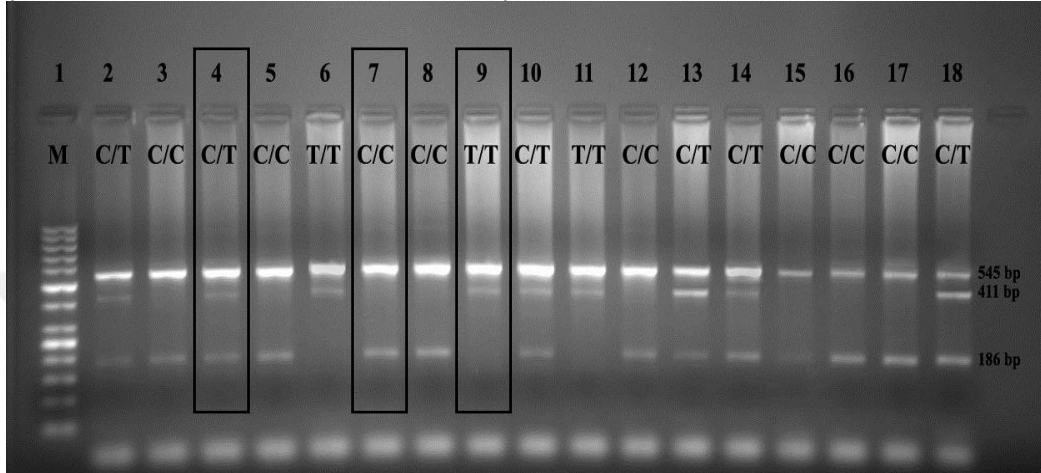


3: H13, 5:H20, 9:H28.

#### 4.2.3. *rs7359397 (c. \*518 C>T)*

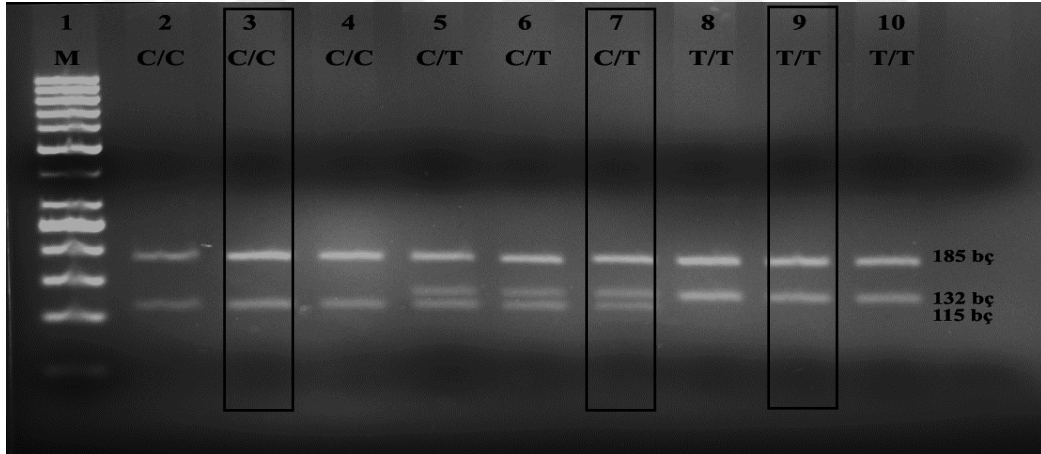
Aşağıdaki Şekil 4.13 Taguchi analizinden sonra belirlenen optimum seviyelerdeki Tetra-ARMS PZR sonuçlarını göstermektedir. İşaretili örnekler farklı bireylere ait homozigot normal (H13), heterozigot (H20), homozigot mutant (H28) genotipleri göstermektedir.

Şekil 4.13. *rs7359397* Tetra-ARMS PZR sonuçları.



4: H20, 7: H13, 9: H28.

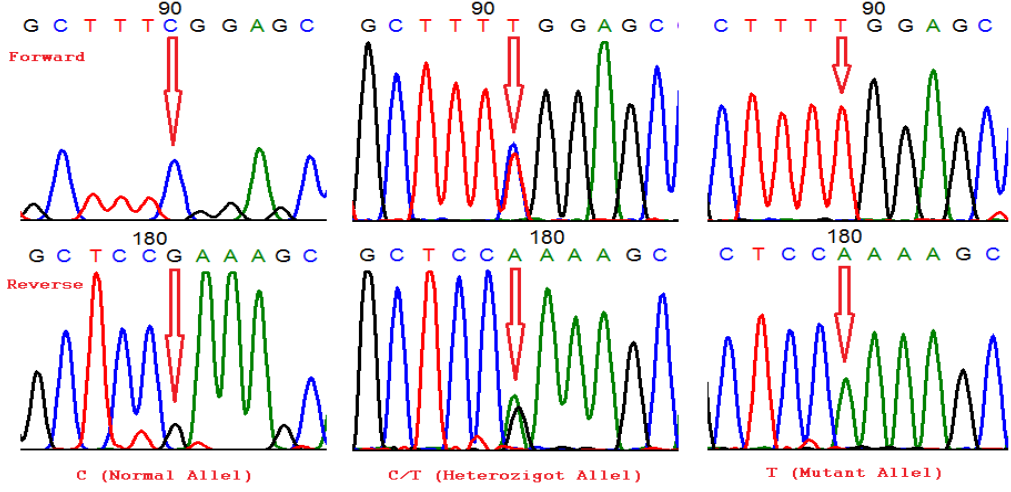
Şekil 4.14. *rs7359397* RFLP sonucu.



M:50 bç; 3: H13, 7:H20, 9:H28.

Aşağıdaki Şekil 4.15 genotipleri belirlenen bireylerin dizi analizi sonuçlarını göstermektedir. Alleller kırmızı oklar ile işaretlenmiştir. Buna göre pozitif iplik (üst) sırayla TTCG homozigot normal alleli, TTC/TC heterozigot alleli, CATC mutant allel dizisini göstermektedir.

Şekil 4.15. rs7359397 dizi analiz sonucu.



H13, H20, H28.

#### 4.3. Klinik Sonuçlar

Klinik parametreler ve buna bağlı olarak oluşturulan alt gruplar ile kontroller arasındaki karşılaştırmalar aşağıdaki Tablo 4.11’de gösterilmiştir.

Tablo 4.11. Bireylerin gruplara göre antropometrik ve klinik değerleri.

	Obez-Hasta (n=89)			Zayıf-Hasta (n=71)			Kontrol (n=76)		
	Ortanca	Minimum	Maksimum	Median	Minimum	Maksimum	Median	Minimum	Maksimum
Yaş*	48	21	68	45	26	71	43	24	62
Boy	170	160	192	174	159	186	174	159	186
Kilo*	99	75	132	80	60	96	78.5	55	93
BMI*	33.75	29.30	42.24	24.77	18.83	27.76	24.21	16.65	27.68
AHI*	38.80	8.5	100.9	27.50	6.1	91.2	2.30	0.2	7.4
Boyun çevresi*	44	38	51	40	37	45	40	34	44
Bel çevresi*	114	97	158	99	67	115	98	71	108
Sistol Kan Basıncı*	130	100	180	120	90	180	120	80	160
Diastol Kan Basıncı*	80	50	120	70	40	110	70	50	100
Saturasyon %O <sub>2</sub> *	90	55	95	92	67	96	93	84	97

\*ANOVA. Gruplar arasında. p<0.05

#### 4.4. Polimorfizmlere ait allel ve genotip sıklıkları

Aşağıdaki Tablo 4.12’de 3 varyanta ait alt gruplar arasındaki genotip sıklıkları gösterilmiştir.

Tablo 4.12. Çalışma gruplarına göre genotip sayıları.

		Genotipler			P değeri	Allel Sıklıkları	
		AA	AG	GG		A	G
<b>rs7498665</b>							
Obez-Hasta	n	46	33	10	0.047	0.70	0.30
Zayıf-Hasta	n	42	24	5		0.76	0.24
Kontrol	n	28	42	6		0.64	0.36
<b>rs4788102</b>							
Obez-Hasta	n	51	28	10	0.007	0.73	0.27
Zayıf-Hasta	n	38	28	5		0.73	0.27
Kontrol	n	26	44	6		0.63	0.37
<b>rs7359397</b>							
Obez-Hasta	n	56	23	10	<0.001	0.76	0.24
Zayıf-Hasta	n	43	23	5		0.77	0.23
Kontrol	n	26	44	6		0.63	0.37

rs7498665: X<sup>2</sup>=9.65. rs4788102: X<sup>2</sup>=14.18. rs7359397: X<sup>2</sup>=20.32; genotipler sayı, alleller % olarak ifade edilmiştir.

Aşağıdaki Tablo 4.13 Zayıf-Hasta ve kontrol alt gruplarına ait genotip sıklıklarının karşılaştırmasını göstermektedir.

Tablo 4.13. Zayıf-Hasta ile kontrol gruplarının varyantlara göre genotip sıklıkları.

		<b>Gruplar</b>				P değeri
		<b>Zayıf-Hasta</b>		<b>Kontrol</b>		
		n	%	n	%	
rs7498665	AA	42	60.0	28	40.0	
	AG	24	36.4	42	63.6	
	GG	5	45.5	6	54.5	
rs4788102	GG	38	60.3	25	39.7	
	GA	28	38.4	45	61.6	
	AA	5	45.5	6	54.5	
rs7359397	CC	43	62.3	26	37.7	
	CT	23	34.3	44	65.7	
	TT	5	45.5	6	54.5	

#### 4.5. Genotiplere göre klinik verilerin karşılaştırılması

Aşağıdaki Tablo 4.14, rs7498665 varyantına ait genotiplerin değişkenlere göre ortalamaları gösterilmektedir. Bu tabloya göre kilo, VKİ ve gece ölçülen oksijen seviyesi değişkenlerin de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Anlamlı çıkan değişkenler için Post-Hoc test olan tukey ile ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Buna göre GG homozigot mutant genotipine sahip bireylerde daha yüksek kilo ve VKİ, daha düşük oksijen düzeyi görülmektedir. Diğer değişkenlerde herhangi bir fark görülmemiştir.

Tablo 4.14. rs7498665 varyantına ait genotiplerin değişkenlere göre ortalamaları.

rs7498665 (n=236)	Genotipler	n	Ortalama	SS	Minimum	Maksimum
Yaş	AA	116	46.64	10	21	66
	AG	99	45.21	10.79	26	71
	GG	21	47.19	8.02	28	64
Boy	AA	116	172.55	6.19	159	190
	AG	99	172.55	6.66	160	192
	GG	21	173.81	5.82	165	183
Kilo*	AA	116	86.81	13.48	55	132
	AG	99	84.75	14.45	56	120
	GG <sup>†</sup>	21	93.95	13.60	71	120
VKİ*	AA	116	28.11	4.96	18.83	40.74
	AG	99	27.34	5.24	16.65	42.24
	GG <sup>†</sup>	21	30.54	5.50	23.38	40.75
AHI	AA	116	28.59	24.25	0.4	99
	AG	99	25.32	28.60	0.2	100.9
	GG	21	26.87	26.41	0.7	86.5
Boyun çevresi	AA	116	41.6	2.88	34	49
	AG	99	41.54	3.23	34	51
	GG	21	42.62	2.96	38	47
Bel çevresi	AA	116	103.91	11.82	67	133
	AG	99	103.65	12.83	71	158
	GG	21	108.95	13.10	90	137
Kolesterol	AA	116	201.22	37.99	99	301
	AG	99	197.36	46.28	105	314
	GG	21	195.86	37.73	138	258
Trigliserit	AA	116	180.67	113.14	63	839
	AG	97	163.18	94.51	38	476
	GG	21	167.86	94.09	70	414
HDL	AA	116	40.59	8.80	22	76
	AG	99	40.48	9.66	26.6	79
	GG	21	37.881	6.84	23.9	59
LDL	AA	116	126.25	32.89	41.6	221
	AG	99	126.78	39.99	49	229
	GG	21	122.38	27.16	79.9	173
Sistol Kan Basıncı	AA	116	122.03	16.85	90	180
	AG	99	124.44	18.52	80	180
	GG	21	128.81	17.02	100	160
Diastol Kan Basıncı	AA	116	74.05	10.71	50	110
	AG	99	75.66	13.81	40	120
	GG	21	74.71	8.82	60	100
Saturasyon %O <sub>2</sub> *	AA	116	90.91	4.67	67	96
	AG	99	91.56	3.94	73	97
	GG <sup>*</sup>	21	87.86	9.24	55	95

ANOVA; \*P<0.05; Post-Hoc Tukey<sup>†</sup>: Kilo: GG>AG (P=0.017); VKİ için GG> G (P=0.03); Saturasyon <sup>\*</sup>: GG>AG (P=0.006) ve AA (P=0.027); SS: Standart Sapma.

Aşağıdaki Tablo 4.15, Zayıf-Hasta ve Kontrol alt gruplarında VKİ'nin genotiplere göre ortalamaları verilmiştir. GG homozigot mutant genotipine sahip bireylerin daha yüksek VKİ değerine sahip olduğu görülmektedir. İkili karşılaştırma da GG genotipi diğerlerinden farklıdır.

Tablo 4.15. Alt gruplarda VKİ'nin genotiplere göre ortalamaları.

rs7498665	VKİ		
	AA	AG	GG
N	70	66	11
Ortalama	24.6	24.19	25.97
SS	19.68	20.40	12.12
Minimum	18.83	16.65	23.38
Maksimum	27.6	27.14	30

Zayıf-hasta+kontrol grubu (n=147); ANOVA P=0.044; Post-Hoc test Tukey : GG>AG (P=0.037); SS: Standart Sapma; İnterquartile Range (IQR): Q1 ve Q3.

Aşağıdaki Tablo 4.16, rs4788102 varyantına ait genotiplerin değişkenlere göre ortalamaları gösterilmektedir. Bu tabloya göre; kilo, VKİ, AHI, boyun çevresi ve gece ölçülen oksijen seviyesi değişkenlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. Anlamlı çıkan değişkenler için Post-Hoc test olan Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Buna göre AA homozigot mutant genotipine sahip bireylerde daha yüksek kilo, VKİ ve boyun çevresi, daha düşük oksijen düzeyi görülmektedir. AHI değişkeni ise, AA ve GA genotipli bireylerde daha düşük GG homozigot normal genotipli bireylerde daha yüksek olduğu görülmektedir. Diğer değişkenlerde ise herhangi bir fark görülmemiştir.

Tablo 4.16. rs4788102 varyantına ait genotiplerin değişkenlere göre ortalamaları.

rs4788102 (n=236)	Genotipler	n	Ortalama	SS	Minimum	Maksimum
Yaş	GG	125	47.18	9.48	21	66
	GA	90	44.32	11.14	26	71
	AA	21	47.19	8.02	28	64
Boy	GG	125	172.42	6.42	159	190
	GA	90	172.72	6.39	160	192
	AA	21	173.81	5.82	165	183
Kilo*	GG	125	87.88	15.00	55	132
	GA	90	83.06	12.28	56	118
	AA	21	93.95	13.60	71	120
VKİ*	GG	125	28.58	5.40	18.83	41.87
	GA	90	26.62	4.56	16.65	42.24
	AA	21	30.31	5.50	23.38	40.75
AHI*	GG	125	30.68	24.84	0.4	99
	GA	90	22.08	27.42	0.2	100.9
	AA	21	26.87	26.41	0.7	86.5
Boyun çevresi*	GG	125	41.93	3.05	34	49
	GA	90	41.08	2.98	34	51
	AA	21	42.62	2.96	38	47
Bel çevresi	GG	125	104.64	12.42	67	133
	GA	90	102.61	12.07	71	158
	AA	21	108.95	13.10	90	137
Kolesterol	GG	125	200.75	39.56	99	301
	GA	90	197.62	44.66	105	314
	AA	21	195.86	37.73	138	258
Trigliserit	GG	125	176.52	109.15	63	839
	GA	88	167.28	100.54	38	476
	AA	21	167.86	94.09	70	414
HDL	GG	125	40.48	8.73	22	76
	GA	90	40.63	9.71	26.6	79
	AA	21	37.88	6.84	23.9	59
LDL	GG	125	124.78	32.28	41.6	209
	GA	90	128.88	40.31	60	229
	AA	21	122.381	27.16	79.9	173
Sistol Kan Basıncı	GG	125	124.92	18.87	90	180
	GA	90	120.67	16.07	80	160
	AA	21	128.81	17.02	100	160
Diastol Kan Basıncı	GG	125	75.6	12.27	50	120
	GA	90	73.67	12.19	40	100
	AA	21	74.71	8.82	60	100
Saturasyon %O <sub>2</sub> *	GG	125	90.69	5.05	67	97
	GA	90	91.92	3.28	78	97
	AA	21	87.86	9.24	55	95

Kruskal Wallis test: \*P<0.05; Kilo: P= 0.003, VKİ: P= 0.017, AHI: P= 0.003, Saturasyon: P= 0.036

Kilo: GA > GG (0.023) ve AA (0.001); VKİ: GA > GG (0.046) ve AA (0.013)

AHI: GG > GA (0.001); Boyun: GA > GG (0.029) ve AA (0.033);

Saturasyon: GA > GG (0.050) ve AA (0.031) ; SS: Standart Sapma.



Aşağıdaki Tablo 4.17, Zayıf-Hasta ve Kontrol alt gruplarında AHI'nin genotiplere göre ortalamaları verilmiştir. GG normal genotipe sahip bireylerin daha yüksek AHI değerine sahip olduğu görülmektedir. İkili karşılaştırmada GG genotipi diğerlerinden farklıdır.

Tablo 4.17. Alt gruplarda AHI'nin genotiplere göre ortalamaları.

rs4788102	AHI		
	GG	GA	AA
n	63	73	11
Ortalama	20.72	13.02	10.29
Ortanca	13	4.2	2.4
Standart sapma	20.26	19.66	12.12
Minimum	0.4	0.2	0.7
Maksimum	88.5	91	32
Q1	4.2	2	1.3
Q3	33.9	19.3	18.1

$X^2=11.85$ ,  $P=0.03$ ; post-Hoc Mann U: AHI: GG>GA ( $P=0.001$ ); İnterquartile Range (IQR): Q1 ve Q3.

Aşağıdaki Tablo 4.18, rs7359397 varyantına ait genotiplerin değişkenlere göre ortalamalarını gösterilmektedir. Bu tabloya göre; kilo, VKİ, AHI, boyun çevresi ve gece ölçülen oksijen seviyesi değişkenlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. Anlamlı çıkan değişkenler için Post-Hoc test olan Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Buna göre TT homozigot mutant genotipine sahip bireylerde daha yüksek kilo, VKİ ve boyun çevresi, daha düşük oksijen düzeyi görülmektedir. AHI değişkeni ise, TT ve CT genotipli bireylerde daha düşük CC homozigot normal genotipli bireylerde daha yüksek olduğu görülmektedir. Diğer değişkenlerde herhangi bir fark görülmemiştir.

Tablo 4.18. rs7359397 varyantına ait genotiplerin değişkenlere göre ortalamaları.

rs7359397 (n=236)		n	Ortalama	SS	Minimum	Maksimum
Yaş	CC	125	47.18	9.64	21	66
	CT	90	44.32	11.15	26	71
	TT	21	47.19	8.02	28	64
Boy	CC	125	172.42	6.30	159	190
	CT	90	172.72	6.56	160	192
	TT	21	173.81	5.82	165	183
Kilo*	CC	125	87.88	14.57	55	132
	CT	90	83.06	12.58	56	118
	TT	21	93.95	13.60	71	120
VKİ*	CC	125	28.58	5.26	18.83	41.87
	CT	90	26.62	4.64	16.65	42.24
	TT	21	30.31	5.50	23.38	40.75
AHI*	CC	125	30.68	24.66	0.4	99
	CT	90	22.09	27.86	0.2	100.9
	TT	21	26.87	26.41	0.7	86.5
Boyun çevresi*	CC	125	41.93	3.02	34	49
	CT	90	41.08	3.02	34	51
	TT	21	42.62	2.96	38	47
Bel çevresi	CC	125	104.64	12.07	67	133
	CT	90	102.61	12.52	71	158
	TT	21	108.95	13.10	90	137
Kolesterol	CC	125	200.75	38.26	99	301
	CT	90	197.62	46.76	105	314
	TT	21	195.86	37.73	138	258
Trigliserit	CC	125	176.52	107.27	63	839
	CT	88	167.28	102.53	38	476
	TT	21	167.86	94.09	70	414
HDL	CC	125	40.49	8.80	22	76
	CT	90	40.63	9.74	26.6	79
	TT	21	37.88	6.84	23.9	59
LDL	CC	125	124.78	31.35	41.6	209
	CT	90	128.88	42.20	60	229
	TT	21	122.38	27.16	79.9	173
Sistol Kan Basıncı	CC	125	124.92	18.90	90	180
	CT	90	120.67	15.47	80	160
	TT	21	128.81	17.02	100	160
Diastol Kan Basıncı	CC	125	75.6	12.66	50	120
	CT	90	73.67	11.58	40	100
	TT	21	74.71	8.82	60	100
Saturasyon %O <sub>2</sub> *	CC	125	90.69	4.90	67	97
	CT	90	91.92	3.35	78	97
	TT	21	87.86	9.24	55	95

Kruskal Wallis testi P değerleri: Kilo (0.001); VKİ: (0.006); AHI: (0.001); Boyun Çevresi: (0.034); Saturasyon: (0.043).

Post-Hoc test: Mann-Whitney U (P değeri)

Kilo: CC>CT (0.007) ve TT (0.001); VKİ: CT>CC (0.015) ve TT (0.009); AHI: CC>CT (0.001);

Boyun: CT>TT (0.031); Saturasyon: CT>TT (0.031); ; SS: Standart Sapma.

Aşağıdaki Tablo 4.19, Zayıf-Hasta ve Kontrol alt gruplarında AHI'nin genotiplere göre ortalamaları verilmiştir. CC normal genotipe sahip bireylerin daha yüksek AHI değerine sahip olduğu görülmektedir. İkili karşılaştırmada CC genotipi diğerlerinden farklıdır.

Tablo 4.19 Alt gruplarda AHI'nin genotiplere göre ortalamaları.

<b>rs7359397 (n=147)</b>	<b>AHI</b>		
	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>
N	69	67	11
Mean	20.60	12.44	10.29
Median	13	4	2.4
Standart sapma	19.92	19.86	12.12
Min	0.4	0.2	0.7
Maksimum	88.5	91	32
Q1	4.2	2	1.3
Q3	33.9	19.3	18.1

Kruskal Wallis:  $X^2=15.525$ ,  $P<0.001$ ; Mann Whitney U (P değeri): CC>CT (0.001) ve TT (0.05) ;  
İnterquartile Range (IQR): Q1 ve Q3.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez projesi obezite ile ilişkili olduğu gösterilen SH2B1 geninde bulunan rs7498665 (A>G), 5'-UTR rs4788102 (G>A) ve 3'-UTR rs7359397 (C>T) polimorfizmlerinin OSA'lı erkek bireylerdeki uyku parametreleri, VKİ üzerine etkisi ve genotip sıklıklarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu varyasyonlarla ilgili olan çalışmalar daha çok obezite, VKİ, vücut yağ dağılımı gibi parametrelerle ilişkilendirilmiştir. Örneklerden elde edilen genotipler, alt gruplar arasında hem klinik parametreler ile hem de genotip sıklıkları açısından karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma, klinik olarak hasta grupların kontrollerden farklı olduğunu ve hasta gruplar içinde obez bireylerin diğer zayıf hastalardan daha kötü klinik sonuçlarla karşılaştığı görülmüştür. Çalışmamızda oluşturulan gruplar arasında klinik parametreler açısından kan yağları ve boy değişkeni ( $P>0,05$ ) hariç diğerlerinde istatistiksel olarak farklılık görülmüştür ( $P<0,05$ ). Vastermark ve arkadaşları (2012), yaptıkları araştırmada kan yağları ile ilgili olarak, sağlıklı İsveç popülasyonunda iki polimorfizmin (rs7498665 ve rs4788102) obezite parametrelerinden trigliserit seviyeleri ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmışlardır (Vastermark ve Jacobsson 2012).

Genotipleme yöntemi olarak seçilen Tetra-ARMS PZR yönteminin optimizasyonu Taguchi metoduna göre yapılmış ve tekniğin hassasiyet değerlendirmesi ile PZR için en uygun optimize parametrelerini seçilmesi sağlanmıştır.

Çalışılan polimorfizmlere ait genotip sıklıkları gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı görünmektedir. ( $P<0,05$ ; Tablo 4.12). Üç polimorfizm için, homozigot normal genotipler hasta gruplar içinde sayısının daha fazla, kontrol grubunda ise heterozigot genotiplerin sayısının diğerlerine göre daha fazla olmakla birlikte Obez-Hasta grubunda homozigot mutant genotip sayısı diğerlerine göre yaklaşık 2 kat daha fazla gözlenmiştir.

rs7498665 için tüm bireyler dahil edildiğinde elde edilen genotipler ile ölçülen değişkenler arasında kilo, VKİ ve oksijen değişkenleri istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gösterilmiştir ( $P<0,05$ ). GG mutant genotipi taşıyan bireyler daha yüksek VKİ ve daha düşük oksijen seviyesine sahipti. Bununla birlikte boyun ve bel çevresi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da GG genotipi taşıyan bireylerde daha yüksek çıkmıştır. AHI değişkeni genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı değildi, ancak GG mutant homozigot genotipli bireyler daha düşük değere sahipti.

Oksijen seviyelerindeki bu düşüş AHI'den bağımsız olarak VKİ'nin yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir. Zayıf-Hasta ve Kontrol gruplarındaki GG genotipli bireylerde daha yüksek VKİ değeri gözlenmiştir.

Araştırma sonuçlarımız literatürle uyumlu olarak, rs7498665 polimorfizminin VKİ ile bağlantılı olduğunu ve OSA ile doğrudan bir ilişkisi olmadığını göstermiştir. Bu varyasyon, çalışmamızda OSA için VKİ 'deki artışa bağlı olarak risk oluşturabilir. Daha önce Thorleifsson ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan, 43 SNP ve 32,615 kişinin dahil edildiği genom çapında ilişkilendirme çalışmasında, SH2B1'de bulunan bu polimorfizmin VKİ ve kilodaki değişimlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Thorleifsson ve Walters 2009). Japon populasyonunda visceral yağ alanların tomografi ölçümleri ile bu varyantın karşılaştırılmasında yağ toplanmasını sağlayan özgün bir genetik faktör olabileceği vurgulanmıştır (Hotta ve Kitamoto 2011). Haupt ve ark (2010), visceral yağlanma ile ilgili MRI ölçüm çalışmasında yaş, cinsiyet eşitlendikten sonraki etkisi de gösterilmiştir ; (Haupt ve Thamer 2010). Belçika'da Beyaz ırka ait 1045 obez ve 317 sağlıklı zayıf bireyde yapılan tekrar çalışmasında rs7498665 minör alleli %26 oranında kompleks obezite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Beckers ve Zegers 2011). 2014 yılında yapılan obezite ile ilgili bir meta-analiz çalışması da bu polimorfizmin obezite ile ilişkili olduğu sonucunu onaylamıştır (Tang ve ark. 2014). Kuzey İsveç'te Tip2 diyabet ve yağlanmanın araştırıldığı çalışmada artmış yağ toplanmasının rs7498665'in özellikle adipoz olmayan dokularla (kemik, kas ve organlar gibi) ilişkili olduğu ve bu karakteristiğin kardiyolojik ve metabolik hastalıkların etyolojisine uygun olabileceği rapor edilmiştir (Renström ve ark. 2009). VKİ ve T2D ile ilgili varyantların ilişkisine bakılan meta-analiz çalışmasında, SH2B1 dahil 7 gen bölgesinin bağlantılı olduğu ve etnik alt gruplara bakıldığında benzer etkisi olduğu da rapor edilmiştir (Xi ve Takeuchi 2014). Almanya'da yapılan 12462 kişilik kohort çalışmasında VKİ ile SH2B1 (rs7498665) ve FTO (rs9935401) genleri arasındaki ilişki doğrulanmış, ancak çalışmadaki yaşam stili ile ilgili herhangi bir ilişki bulunamamıştır (Holzapfel ve ark. 2010). Meksikalı çocuk (6-15 yaş) ve yetişkinlerde (18-82 yaş) obezite ( $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> ve  $< 40$  kg/m<sup>2</sup> arası-sınıf I/II) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (León-Mimila ve ark. 2013). Avrupa'da yeme davranışları üzerine yapılan araştırmada rs925946 (BDNF) ve rs7498665 (SH2B1) ile herhangi bir ilişki olmadığı ancak yaş ve cinsiyet ile birlikte atıştırma davranışı değişkenleri eşitlendiğinde her iki polimorfizmin VKİ üzerinde etkisinin gözlemlendiği belirtilmiştir (Robiou-du-Pont ve ark. 2013).

Çocuklarda kromozomun 16p11.2 bölgesindeki SH2B1'in dahil olduğu delesyonların erken başlayan obezite ve gelişimsel gerilikle ve ciddi insülin direnci ile ilgili olduğu rs7498665 (Tag SNP) kullanılarak gösterilmiştir (Bochukova ve ark. 2010).

rs4788102 varyasyonu için tüm bireyler dahil edildiğinde genotipler arasında kilo, VKİ, AHI, boyun çevresi ve oksijen düzeyi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ortaya çıkmıştır ( $P<0.05$ ; Tablo 4.16). Bu farklılık iki genotip arasında incelendiğinde GA heterozigot genotipe sahip bireyler daha düşük, AA mutant genotipli bireyler daha yüksek değerlere sahiptir ( $P<0,05$ ). Diğer değişkenlerin tersine, oksijen seviyesi ise, GA genotipli bireylerde diğerlerine göre daha yüksek olarak ölçülmüştür. AHI değişkeninde ise GG normal genotipli bireylerde daha yüksek, heterozigotlarda en düşük değerler gözlenmiştir. Ayrıca zayıf-hasta+kontrol grupların da genotip ve AHI değeri karşılaştırıldığında GG normal genotipli bireylerde daha yüksek değerler gözlenmiştir. Araştırma sonuçlarımız literatürle uyumlu olarak rs4788102 polimorfizminin obezite göstergesi olan VKİ ile bağlantılı olduğunu ve bundan bağımsız olarak G normal allelinin OSA için risk faktörü olabileceğini göstermiştir. Yang ve ark (2013) Tayvan'da yaptığı çalışmalarında sigara içme alışkanlığı ile birlikte metabolik sendrom için önemli bir risk faktörü olabileceğini rapor etmişlerdir (Yang ve ark. 2013). SH2B1 (rs4788102) T2D'li hastalarda artmış bir miyokard enfarktüs riski ve insan endotelial kültüründe bozulmuş insülin-aracılı NOS aktivitesinde üzerinde risk oluşturabileceğini belirtmişlerdir (Prudente ve ark. 2011). Gebelik dönemi diyabeti olan ve olmayan hamile kadınların karşılaştırmasında VKİ için risk oluşturabileceği ve tanıda kullanılabileceği vurgulanmıştır (Al-Hakeem 2014).

rs7359397 varyasyonu için benzer şekilde tüm bireyler dahil edildiğinde genotipler arasında kilo, VKİ, AHI, boyun çevresi ve oksijen düzeyi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ( $P<0.05$ ). Bu farklılık iki genotip arasında incelendiğinde CT genotipli bireyler diğer genotipleri taşıyanlara göre anlamlı olarak daha düşük, TT genotipli bireylerde daha yüksek değerlerde gözlendi ( $P<0.05$ ). AHI değişkeninde ise CC normal genotipli bireyler daha yüksek değere sahipti. Oksijen değişkeninde diğer genotiplere göre CT genotipli bireylerde daha yüksek ortalamaya sahipti. Ayrıca Zayıf-Hasta+Kontrol grupların da genotip ve AHI değeri karşılaştırıldığında CC normal genotipli bireylerde daha yüksektir. rs7359397 polimorfizminin obezite göstergesi olan VKİ ile bağlantılı olduğu düşünülebilir. Bundan bağımsız olarak C normal allelinin OSA için risk faktörü olabileceğini göstermiştir.

İsveç'te 71 yaşında 929 erkek birey ile yapılan çalışmada VKİ' deki artışa ilave olarak insülin direncinde bir artış olduğu da gösterilmiştir (Fall ve ark. 2012).

Monsego ve ark (2014), kalori kısıtlı diyet programı uygulanan 47 kişinin katıldığı bir çalışmada ilk kez CpG-SNP olarak çalışılan rs7359397'de DNA metilasyon seviyelerini genotiplere göre karşılaştırıldığında yaklaşık olarak normal genotipte (CC) %80'in üzerinde, mutant genotipte ise (TT) %10'un altında olduğunu göstermişlerdir. Artmış DNA metilasyon seviyeleri ile ilişkili bireylerde azalmış SH2B1 mRNA ekspresyonu göstermişlerdir. Resesif model (CC/CT>TT) ile antropometrik ölçümler karşılaştırıldığında C alleli taşıyan bireylerin daha yüksek vücut ağırlığı, VKİ ve vücut yağ kitlesine sahip olduğu belirlenmiştir (Mansego ve ark. 2014). Çalışmamızda ise 6. ekzonda bulunan rs7498665 hariç diğer polimorfizmlerin kodlanan bölgelerin dışında olması ve normal allel (rs4788102 [G] ve rs7359397 [C]) taşıyan bireylerde daha yüksek AHI değerinin çıkması (Mansego ve Milagro 2014)'ya benzer olarak OSA'lı bireylerde metilasyona bağlı SH2B1 fonksiyonunun epigenetik açıdan etkilendiğini düşündürmektedir.

Leptin ve reseptörü üzerinde yapılan çalışmalar obezite, iştahın kontrolü ve insülin direnci için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. Bu anlamda Leptin/reseptör kompleksinin hücre sel sinyaldeki rolü ve diğer yollarla etkileşiminin belirlenmesi daha da önem kazanmaktadır (Wauman ve ark. 2017). Hücre sel Jak/Stat sinyal yolağında adaptör ve sinyal arttırıcı protein olarak görev yapan SH2B1'in de obezite, metabolik sendrom, OSA gibi multifaktöriyel hastalıklar üzerindeki etkisi değerlendirilmelidir. OSA için, leptin reseptöründeki iki varyantın (Pro1019Pro ve Gln223Arg) incelendiği meta-analiz çalışmasında incelenen 2125 makele içinden 9 yayın analizlere dahil edilmiştir. Bunlar 5 farklı ırk kapsamaktadır (Beyaz ırk, Türk, Çin, Han popülasyonu ve Japon). Burada Türk ırkına ait genotipler daha önce 2010 yılında özetinin yayınladığı Gln223Arg'ye ait genotip sayı ve sıklıklarına ait verileri içeriyordu (Kuccukturk ve ark. 2010). Bu meta analiz çalışmasında her iki varyasyonun özellikle Çin (Pro1019Pro) ve Kafkas (Gln223Arg) popülasyonlarında OSA için önemli bir risk faktörü olarak değerlendirmişlerdir (Xu ve ark. 2017). Bu açıdan LepR sinyallenmesine dahil olan moleküller ile ilgili yapılan bazı çalışmalar SH2B1'in önemini ortaya çıkarmıştır.

Doche ve ark (2012), SH2B1 fonksiyonu üzerine yaptıkları çalışmada insanda gıda alımı, vücut ağırlığı ve uyumsuz davranışlarla ilişkili kritik bir rolü olduğu rapor edilmiştir (Doche ve ark. 2012).

SH2B1'in fonksiyonu üzerindeki çalışmalarda izoformlardaki genetik bozulmalar vücut ağırlığının düzenlenmesi ile ilgili olduğu ve  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  izoformlarının C-teminal bölgelerinin nasıl bozulduğunun anlaşılmasının önemli olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Pearce ve ark. 2014).

Jamshidi ve arkadaşları (2007), 2455 normal kadın ikizler üzerinde yapılan bir çalışmada, SH2B1'deki rs7498665 polimorfizminin leptin tarafından vücut ağırlığı ve yağın düzenlenmesine aracılık ettiği ve SH2B sinyallenmesi diyetle-uyarılan obezitede azaltıldığı gösterilirse ilaçla-uyarılan leptin duyarlılığı için bir hedef olabileceği rapor edilmiştir (Jamshidi ve ark. 2007).

*In vitro* adiposit doku farklılaşmasında SH2B1'in düzenleyici bir rolünün olmadığı ancak adipoz doku ile diğer insan cDNA doku panellerinde ekspresyon profillerinin karşılaştırılmasında sırayla azalan bir şekilde hipofiz bezi, pankreas, böbrek-ovaryum, lenf nodu, iskelet kası, mide ve timus dokularında eksprese olduğu gösterilmişlerdir (Bernhard ve ark. 2013). Bu durum SH2B1'in fonksiyonlarına bakıldığında iştahın nöronal kontrolü (hipofiz) ve insülin (pankreas) seviyesinin kontrolünde daha çok rol aldığı da düşünülebilir.

Çalışılan her üç varyasyon için ayrı ayrı laboratuvar tecrübesine dayalı PZR reaksiyonu oluşturulmuş ve burada ki konsantrasyonlar optimizasyon reaksiyonlarına öncülük etmiştir. Optimizasyon reaksiyonları istatistiksel olarak ortogonal deneme düzeni şeklinde tasarlanan Taguchi metoduna göre dizayn edilmiştir. Taguchi analizlerinden "*en büyük en iyi*" metoduna göre tahmin edilmiş sonuçlar, tekrar deneyleri ile onaylanmış ve PZR reaksiyonları için kullanılmıştır. Tetra-ARMS PZR genotipleme metodu ile elde edilen genotipler, RFLP ve dizi analiz metodları ile beklenen profillerin doğruluğu değerlendirilmiş ve metodun bazı zorlukları olsa da hassas ve etkin olduğu düşünülmüştür. Çalışmada karşılaşılan zorluklar arasında hedef bölgeye özgü primer tasarlamadaki hassasiyet ön planda değerlendirilmiştir. Taguchi metodu ile aşılacak ikinci zorluk olarak, PZR reaksiyonlarındaki komponentlerin optimal konsantrasyonlarının belirlenmesi olmuştur.

Bu sonuçlara göre, Tetra-ARMS PZR yönteminin genotipleri belirlemede hassas, doğru, maliyet olarak ucuz ve zamandan tasarruf sağlayan bir metod olarak çalışmamızda avantajlı olduğu da düşünülmüştür. Ayrıca Taguchi metodu da endüstriyel süreçte daha sık kullanılmasına rağmen moleküler metodlar için optimizasyon deneylerinde en az 2 faktörlü ve 2 seviyeli analizler tasarlanarak etkin şekilde kullanılabilir.



Onam formu alınan 236 bireyin kan örneklerinden genotip tayini yapılmış ve analiz edilen 3 SNP noktasında rs4788102, rs7498665 ve rs7359397 Türk toplumundaki obez-erkek ve zayıf-erkek bireyler için polimorfizm belirlenmiştir. Buna rağmen, çalışılan SNP noktalarının polimorfizmleri ile ilgili kesin bir kanaate varabilmek ve söz konusu noktaları genotipleme, ilgili gen bölgesi ve yolak/pathway'lerde kullanabilmek için hasta olan tüm insan popülasyonları üzerinde çalışmaların yapılması zorunludur. Çünkü, beslenme, aktivite ve çeşitli yaşamsal faaliyetler gibi çevresel faktörlerde parametreler içerisine dahil edilmelidir.

Bu tez çalışması kapsamında, daha çok erkek bireylerde gözlenen bir hastalık incelendiği için, klasik istatistiksel yöntemlerin gerektirdiği sayılar, hastalık açısından risk taşıyan Türk toplumu için seçilmiş ve sınırlı parametreler olduğundan dolayı detaylı verilere ulaşamamıştır. Kadın bireyler hormonal, menopozal gibi fizyolojik değişikliklerin etkisini dışlamak için çalışmaya dahil edilmemiştir.

Tez projesinde, klinik ve genomik düzeyde Türk toplumuna ait diğer çalışmalarda da kullanılabilmesi için hastalıkla ilişkili olarak seçilen genotiplerin uygunluğunun belirlenmesinin yanısıra, hasta ve sağlıklı bireylere ait kan örneklerinde modifiye DNA izolasyon metodlarının geliştirilmesi, PZR a dayalı tetra- ARMS tekniğinin ve Taguchi yöntemiyle PZR optimizasyon koşullarının tanımlanması sağlanmıştır. Dizi analizi ve PZR'ye dayalı diğer moleküler genotipleme yöntemlerinden olan PZR-RFLP ile çalışılan 3 polimorfizmin literatürle uyumlu olarak VKİ ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada rs7498665 polimorfizmi VKİ ile ilişkilendirilmiştir. SH2B1 bölgesinin düzenleyici bölgesinde yer alan 5'-UTR rs4788102 ve 3'-UTR rs7359397 polimorfizmleri, VKİ'ye ilave olarak, OSA üzerinde AHI değeri ile ilişkilendirilmiştir. G (rs4788102) ve C (rs7359397) normal alleli taşıyan bireylerde SH2B1 OSA'nın şiddetini arttıran bir role de sahip olabilir.

Obezite ile ilişkili SH2B1 gen varyantlarının uyku apnesi ile bağlantı potansiyelinin belirlenmesi ile ilgili olan tez çalışmasındaki analizlerden elde edilen sonuçlar, bir anlamda genom üzerinde obeziteye özgü SH2B1 gen varyantlarından özellikle 5'-UTR rs4788102 ve 3'-UTR rs7359397' in uyku apnesi ile ilintili olabilecek lokusları işaret eden bir referans özelliğini de taşımaktadır.

### 5.1. Öneriler

- Çalışma daha geniş bir örneklem ve farklı popülasyonlarda tekrarlanmalıdır.
- Cinsiyet, ırk, yaş gibi faktörler de dikkate alınarak yapılacak çalışmalarla SH2B1 üzerindeki varyasyonların etkilerine bakılabilir.
- Hastalıkla ilgili biyokimyasal ve diğer genetik parametreler ile birlikte değerlendirilerek, gelecekte daha kapsamlı hale getirilerek genetik algoritmalarla yeni SNP'ler keşfedilebilir ve çalışılabilir. Hatta farklı SNP ve genotiplerle birlikte nadir görülen haplotiplerde araştırılabilir.
- OSA cerrahisi sonrası üst havayolundan alınacak dokulardan SH2B1 mRNA ekspresyon seviyeleri, metilasyon oranları ve histopatolojik özellikleri farklı SNP ve genotipler dikkate alınarak etkisi değerlendirilmelidir.
- SH2B1'in sadece OSA ile ilgili olarak obeziteye bağlı değil, nöronal kontrol, kas fonksiyonu ve insülin sensitivitesine etkisinin incelenmesi de hastalığın patolojisine katkı sağlayabilir.
- Yapılan araştırmalara göre klinik olarak önemli olan uyku apneli vakalarda ilgili SNP'lerin kullanılması ve moleküler metodların modifiye edilmesinde bu tez çalışmasının lisansüstü öğrencilere konuyla ilgili araştırmalarında bir ışık tutacağı düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Al-Hakeem MM. Implication of SH2B1 gene polymorphism studies in gestational diabetes mellitus in Saudi pregnant women. *Saudi J Biol Sci.* 2014;21(6):610-15.
2. Bachmann-Gagescu R, Mefford HC, Cowan C, Glew GM, Hing AV, Wallace S, ve ark. Recurrent 200-kb deletions of 16p11.2 that include the SH2B1 gene are associated with developmental delay and obesity. *Genet Med.* 2010;12(10):641-7.
3. Banno K, Kryger MH. Sleep apnea: clinical investigations in humans. *Sleep Med.* 2007;8(4):400-26.
4. Barcelo A, Barbe F, Llornpart E, de la Pena M, Duran-Cantolla J, Ladaria A, ve ark. Neuropeptide Y and leptin in patients with obstructive sleep apnea syndrome: role of obesity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(2):183-7.
5. Basoglu OK, Sarac F, Sarac S, Uluer H, Yilmaz C. Metabolic syndrome, insulin resistance, fibrinogen, homocysteine, leptin, and C-reactive protein in obese patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Ann Thorac Med.* 2011;6.
6. Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AWK, Wang Y, ve ark. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature.* 2003;421(6925):856-59.
7. Bauer F, Elbers CC, Adan RA, Loos RJ, Onland-Moret NC, Grobbee DE, ve ark. Obesity genes identified in genome-wide association studies are associated with adiposity measures and potentially with nutrient-specific food preference. *Am J Clin Nutr.* 2009.
8. Bayram F. Tanı, Obezite, ve Tedavi Kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği 2. 2015:Baskı, Pelin Ofset Matbaacılık Ltd. Şti, Ankara.
9. Beckers S, Zegers D, Van Gaal LF, Van Hul W. Replication of the SH2B1 rs7498665 association with obesity in a Belgian study population. *Obesity facts.* 2011;4(6):473-77.
10. Bernhard F, Landgraf K, Klötting N, Berthold A, Büttner P, Friebe D, ve ark. Functional relevance of genes implicated by obesity genome-wide association study signals for human adipocyte biology. *Diabetologia.* 2013;56(2):311-22.
11. Berry RB, Brooks R, Gamaldo CE, Harding SM, Marcus C, Vaughn B. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events. Rules, Terminology and Technical Specifications, Darien, Illinois, American Academy of Sleep Medicine. 2012.
12. Bixler EO, Vgontzas AN, Lin HM, Ten Have T, Rein J, Vela-Bueno A, ve ark. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(3 Pt 1):608-13.
13. Bochukova EG, Huang N, Keogh J, Henning E, Purmann C, Blaszczyk K, ve ark. Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature.* 2010;463(7281):666-70.
14. Boleda M, Briones P, Farres J, Tyfield L, Pi R. Experimental design: a useful tool for PCR optimization. *BioTechniques.* 1996;21(1):134-41.
15. Burack B, Pollak C, Borowiecki B, Weitzman E, editors. Hypersomnia-Sleep Apnea Syndrome (Hsa)-Reversible Major Cardiovascular Hazard. *Circulation*; 1977: Amer Heart Assoc 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231-4596.
16. Burwell CS, Robin ED, Whaley RD, Bickelmann AG. Extreme obesity associated with alveolar hypoventilation—a Pickwickian syndrome. *Am J Med.* 1956;21(5):811-18.
17. Campana L, Eckert DJ, Patel SR, Malhotra A. Pathophysiology & genetics of obstructive sleep apnoea. *Indian J Med Res.* 2010;131:176.
18. Caples SM, Gami AS, Somers VK. Obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med.* 2005;142(3):187-97.
19. Chua S, Jr. SH2B1--the adaptor protein that could. *Endocrinology.* 2010;151(9):4100-2.
20. Cobb BD, Clarkson JM. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(18):3801-05.
21. Çiftçi TU. Obstrüktif Uyku Apne Sendromu Tanı Ve Tedavi Uzlaşı Raporu. İstanbul: Aves Yayıncılık, 2012 1302-7808 Contract No.: Supplement 1.
22. Dehnad K. Quality control. Robust Design, and the Taguchi Method, Pacific Grove, CA: Wadsworth. 1989.

23. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of Sleep Apnea. *Physiol Rev.* 2010;90(1):47-112.
24. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, ve ark. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature.* 1996;380(6570):152-54.
25. Doche ME, Bochukova EG, Su H-W, Pearce LR, Keogh JM, Henning E, ve ark. Human SH2B1 mutations are associated with maladaptive behaviors and obesity. *J Clin Invest.* 2012;122(12):4732-36.
26. Eckert DJ, Malhotra A. Pathophysiology of Adult Obstructive Sleep Apnea. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(2):144-53.
27. El Bayadi S, Millman RP, Tishler PV, Rosenberg C, Saliski W, Boucher MA, ve ark. A family study of sleep apnea. Anatomic and physiologic interactions. *Chest.* 1990;98(3):554-9.
28. Fall T, Ärnlöv J, Berne C, Ingelsson E. The role of obesity-related genetic loci in insulin sensitivity. *Diabetic Medicine.* 2012;29(7):e62-e66.
29. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical Journal.* 2006;393(1):7-20.
30. Gao S, Kinzig KP, Aja S, Scott KA, Keung W, Kelly S, ve ark. Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(44):17358-63.
31. Gaonkar S, Karanjavkar N, Kadam S. Taguchi Method. *IJSRSET.* 2016;2(2):843-45.
32. Gharibeh T, Mehra R. Obstructive sleep apnea syndrome: natural history, diagnosis, and emerging treatment options. *Nat Sci Sleep.* 2010;2(10):233-55.
33. Gottlieb DJ, O'Connor GT, Wilk JB. Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC Medical Genetics.* 2007;8(Suppl 1):S9-S9.
34. Gökçe B, Taşgetiren S. Kalite İçin Deney Tasarımı. *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi.* 2009;6(1):71-83.
35. Greenburg DL, Lettieri CJ, Eliasson AH. Effects of surgical weight loss on measures of obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Am J Med.* 2009;122(6):535-42.
36. Guilleminault C, Abad VC. Obstructive sleep apnea syndromes. *Med Clin North Am.* 2004;88(3):611-30, viii.
37. Guilleminault C, Connolly SJ, Winkle RA. Cardiac arrhythmia and conduction disturbances during sleep in 400 patients with sleep apnea syndrome. *Am J Cardiol.* 1983;52(5):490-4.
38. Guilleminault C, Eldridge FL, Dement WC. Insomnia with sleep apnea: a new syndrome. *Science.* 1973;181(4102):856-8.
39. Guilleminault C, Riley R, Powell N. Obstructive sleep apnea and abnormal cephalometric measurements. Implications for treatment. *Chest.* 1984;86(5):793-4.
40. Haidong Z. Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Hypertension: Methods and Protocols.* 2005:149-58.
41. Haupt A, Thamer C, Heni M, Machicao F, Machann J, Schick F, ve ark. Novel Obesity Risk Loci Do Not Determine Distribution of Body Fat Depots: A Whole-body MRI/MRS study. *Obesity.* 2010;18(6):1212-17.
42. Heaton PA, Keer JT. DNA Quantification. *Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach.* 2008:83.
43. Holzapfel C, Grallert H, Huth C, Wahl S, Fischer B, Döring A, ve ark. Genes and lifestyle factors in obesity: results from 12 462 subjects from MONICA/KORA. *International journal of obesity (2005).* 2010;34(10):1538-45.
44. Hotta K, Kitamoto T, Kitamoto A, Mizusawa S, Matsuo T, Nakata Y, ve ark. Computed tomography analysis of the association between the SH2B1 rs7498665 single-nucleotide polymorphism and visceral fat area. *J Hum Genet.* 2011;56(10):716-19.
45. Jamshidi Y, Snieder H, Ge D, Spector TD, O'Dell SD. The SH2B gene is associated with serum leptin and body fat in normal female twins. *Obesity (Silver Spring, Md).* 2007;15(1):5-9.

46. Jiang L, Li Z, Rui L. Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways. *J Biol Chem*. 2008;283(42):28066-73.
47. Johns MW. Daytime Sleepiness, Snoring, and Obstructive Sleep Apnea: The Epworth Sleepiness Scale. *Chest*. 1993;103(1):30-36.
48. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep*. 1991;14(6):540-5.
49. Kaparianos A, Sampsonas F, Karkoulas K, Spiropoulos K. Obstructive sleep apnoea syndrome and genes. *Neth J Med*. 2006;64(8):280-9.
50. Karna SK, Sahai R. An overview on Taguchi method. *International Journal of Engineering & Mathematical Sciences*. 2012;1(1):1-7.
51. Koeppen-Schomerus G, Wardle J, Plomin R. A genetic analysis of weight and overweight in 4-year-old twin pairs. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25(6):838-44.
52. Köktürk O. Uykuda solunum bozuklukları, Tarihçe, tanımlar, hastalık spektrumu ve boyutu. *Tuberk Toraks*. 1998;46:187-92.
53. Kuccukturk S, Yosunkaya S, Okur H, Demirel S, Ozer F. Association Analysis of The Gln223Arg Polymorphism in The Human Leptin Receptor Gene, and Traits Related to OSAS And Blood Pressure. *Sleep*. 2010;33:A15-A15.
54. Kurzer JH, Saharinen P, Silvennoinen O, Carter-Su C. Binding of SH2-B Family Members within a Potential Negative Regulatory Region Maintains JAK2 in an Active State. *Mol Cell Biol*. 2006;26(17):6381-94.
55. Larter CZ, Chitturi S, Heydet D, Farrell GC. A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: The metabolic movers. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25(4):672-90.
56. León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S, López-Contreras B, ve ark. Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in mexican children and adults. *PloS one*. 2013;8(8):e70640.
57. Li Z, Zhou Y, Carter-Su C, Myers MG, Jr., Rui L. SH2B1 enhances leptin signaling by both Janus kinase 2 Tyr813 phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *Mol Endocrinol*. 2007;21(9):2270-81.
58. Little S. Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) Analysis of Point Mutations. *Current protocols in human genetics*. 2001;Vol. 9.8: p.1-12.
59. Loh K, Herzog H, Shi Y-C. Regulation of energy homeostasis by the NPY system. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(3):125-35.
60. Mansego ML, Milagro FI, Zulet MA, Martinez JA. SH2B1 CpG-SNP is associated with body weight reduction in obese subjects following a dietary restriction program. *Ann Nutr Metab*. 2014;66(1):1-9.
61. Marik PE. Leptin, obesity, and obstructive sleep apnea. *Chest*. 2000;118(3):569-71.
62. Matsuoka N, Ogawa Y, Hosoda K, Matsuda J, Masuzaki H, Miyawaki T, ve ark. Human leptin receptor gene in obese Japanese subjects: evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity. *Diabetologia*. 1997;40(10):1204-10.
63. Maures TJ, Kurzer JH, Carter-Su C. SH2B1 (SH2-B) and JAK2: a multifunctional adaptor protein and kinase made for each other. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18(1):38-45.
64. Medrano RF, de Oliveira CA. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Mol Biotechnol*. 2014;56(7):599-608.
65. Montgomery DC. *Design and Analysis of Experiments*, 8th Edition: John Wiley & Sons, Incorporated; 2012.
66. Morris DL. *SH2B1 Regulates Insulin Sensitivity and Glucose Homeostasis by Multiple Mechanisms: The University of Michigan*; 2009.
67. Morris DL, Cho KW, Rui L. Critical role of the Src homology 2 (SH2) domain of neuronal SH2B1 in the regulation of body weight and glucose homeostasis in mice. *Endocrinology*. 2010;151(8):3643-51.
68. Murakami T, Yamashita T, Iida M, Kuwajima M, Shima K. A Short Form of Leptin Receptor Performs Signal Transduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231(1):26-29.

69. NCBI. National Center for Biotechnology Information Retrieved 26 March 2017  
from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; 2017 [updated Retrieved 26 March 2017]. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
70. Nelms K, O'Neill TJ, Li S, Hubbard SR, Gustafson TA, Paul WE. Alternative splicing, gene localization, and binding of SH2-B to the insulin receptor kinase domain. *Mamm Genome*. 1999;10(12):1160-7.
71. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989;17(7):2503-16.
72. O'Brien KB, O'Shea JJ, Carter-Su C. SH2-B family members differentially regulate JAK family tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 2002;277(10):8673-81.
73. Ogawa T, Hirose H, Yamamoto Y, Nishikai K, Miyashita K, Nakamura H, et al. Relationships between serum soluble leptin receptor level and serum leptin and adiponectin levels, insulin resistance index, lipid profile, and leptin receptor gene polymorphisms in the Japanese population. *Metabolism*. 2004;53(7):879-85.
74. Ohtsuka S, Takaki S, Iseki M, Miyoshi K, Nakagata N, Kataoka Y, et al. SH2-B is required for both male and female reproduction. *Mol Cell Biol*. 2002;22(9):3066-77.
75. Oppermann H, Levinson AD, Varmus HE, Levintow L, Bishop JM. Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(4):1804-08.
76. Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nat Protocols*. 2007;2(11):2857-64.
77. Palmer LJ, Buxbaum SG, Larkin E, Patel SR, Elston RC, Tishler PV, et al. A Whole-Genome Scan for Obstructive Sleep Apnea and Obesity. *Am J Hum Genet*. 2003;72(2):340-50.
78. Parish JM, Adam T, Facchiano L. Relationship of Metabolic Syndrome and Obstructive Sleep Apnea. *Journal of Clinical Sleep Medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2007;3(5):467-72.
79. Payseur BA, Cutter AD. Integrating patterns of polymorphism at SNPs and STRs. *Trends Genet*. 2006;22(8):424-29.
80. Pearce LR, Joe R, Doche ME, Su H-W, Keogh JM, Henning E, et al. Functional Characterization of Obesity-Associated Variants Involving the  $\alpha$  and  $\beta$  Isoforms of Human SH2B1. *Endocrinology*. 2014;155(9):3219-26.
81. Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA*. 2000;284(23):3015-21.
82. Perez-Iglesias R, Mata I, Amado JA, Berja A, Garcia-Unzueta MT, Garcia OM, et al. Effect of FTO, SH2B1, LEP, and LEPR Polymorphisms on Weight Gain Associated With Antipsychotic Treatment. *J Clin Psychopharmacol*. 2010;30(6):661-66.
83. Perrone L, Marzuillo P, Grandone A, del Giudice EM. Chromosome 16p11.2 deletions: another piece in the genetic puzzle of childhood obesity. *Ital J Pediatr*. 2010;36:43.
84. Pillar G, Lavie P. Assessment of the Role of Inheritance in Sleep Apnea Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(3\_pt\_1):688-91.
85. Prudente S, Copetti M, Morini E, Mendonca C, Andreozzi F, Chandalia M, et al. The SH2B1 obesity locus and abnormal glucose homeostasis: Lack of evidence for association from a meta-analysis in individuals of European ancestry. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2013;23(11):1043-49.
86. Prudente S, Morini E, Larmon J, Andreozzi F, Di Pietro N, Nigro A, et al. The SH2B1 obesity locus is associated with myocardial infarction in diabetic patients and with NO synthase activity in endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2011;219(2):667-72.
87. Ragin CC, Dallal C, Okobia M, Modugno F, Chen J, Garte S, et al. Leptin levels and leptin receptor polymorphism frequency in healthy populations. *Infect Agent Cancer*. 2009;4 Suppl 1:S13.

88. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004;117(8):1281-83.
89. Redline S, Tishler PV. The genetics of sleep apnea. *Sleep Med Rev.* 2000;4(6):583-602.
90. Ren D, Li M, Duan C, Rui L. Identification of SH2-B as a key regulator of leptin sensitivity, energy balance, and body weight in mice. *Cell Metab.* 2005;2(2):95-104.
91. Ren D, Zhou Y, Morris D, Li M, Li Z, Rui L. Neuronal SH2B1 is essential for controlling energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest.* 2007;117(2):397-406.
92. Renström F, Payne F, Nordström A, Brito EC, Rolandsson O, Hallmans G, ve ark. Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Hum Mol Genet.* 2009;18(8):1489-96.
93. Robiou-du-Pont S, Yengo L, Vaillant E, Lobbens S, Durand E, Horber F, ve ark. Common variants near BDNF and SH2B1 show nominal evidence of association with snacking behavior in European populations. *J Mol Med.* 2013;91(9):1109-15.
94. Romero-Corral A, Caples SM, Lopez-Jimenez F, Somers VK. Interactions Between Obesity and Obstructive Sleep Apnea: Implications for Treatment. *Chest.* 2010;137(3):711-19.
95. Roy RK. A primer on the Taguchi method. Dearborn, MI: Society of Manufacturing Engineers; 2010.
96. Rui L. SH2B1 regulation of energy balance, body weight, and glucose metabolism. *World J Diabetes.* 2014;5(4):511-26.
97. Rui L, Carter-Su C. Identification of SH2-B $\beta$  as a potent cytoplasmic activator of the tyrosine kinase Janus kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(13):7172-77.
98. Rui L, Gunter DR, Herrington J, Carter-Su C. Differential binding to and regulation of JAK2 by the SH2 domain and N-terminal region of SH2-B $\beta$ . *Mol Cell Biol.* 2000;20(9):3168-77.
99. Sandholt CH, Vestmar MA, Bille DS, Borglykke A, Almind K, Hansen L, ve ark. Studies of metabolic phenotypic correlates of 15 obesity associated gene variants. *PloS one.* 2011;6(9):e23531.
100. Schulz LC, Widmaier EP. The effect of leptin on mouse trophoblast cell invasion. *Biol Reprod.* 2004;71(6):1963-67.
101. Shea SA, Edwards JK, White DP. Effect of wake-sleep transitions and rapid eye movement sleep on pharyngeal muscle response to negative pressure in humans. *J Physiol.* 1999;520(Pt 3):897-908.
102. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, ve ark. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nature genetics.* 2010;42(11):937-48.
103. Szymanska J, Dobrowolska-Zarzycka M. The influence of upper airways diameter on the intensity of obstructive sleep apnea. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM.* 2014;21(1):217-20.
104. Taguchi G. Taguchi on robust technology development : bringing quality engineering upstream. New York: ASME Press; 1993. xvi, 136 p p.
105. Taguchi G, Chowdhury S, Wu Y. Taguchi's quality engineering handbook: Wiley; 2005.
106. Taguchi G, Clausing D. Robust quality. *Harv Bus Rev.* 1990;68(1):65-75.
107. Takatsu K, Yokomaku T, Kurata S, Kanagawa T. A FRET-based analysis of SNPs without fluorescent probes. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(19):e156-e56.
108. Tang L, Ye H, Hong Q, Chen F, Wang Q, Xu L, ve ark. Meta-analyses between 18 candidate genetic markers and overweight/obesity. *Diagnostic Pathology.* 2014;9(1):56.
109. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem.* 1997;272(10):6093-6.
110. Taylan D. Taguchi deney tasarımı uygulaması: SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü; 2009.
111. Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadottir A, ve ark. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet.* 2009;41(1):18-24.
112. Unal R, Dean EB. Taguchi approach to design optimization for quality and cost: an overview. Langley Research Center. 1990.

113. Van Houwelingen K, Van Uffelen R, Van Vliet A. The sleep apnoea syndromes. *Eur Heart J*. 1999;20(12):858-66.
114. Vastermark A, Jacobsson JA, Johansson A, Fredriksson R, Gyllensten U, Schioth HB. Polymorphisms in *sh2b1* and *spns1* loci are associated with triglyceride levels in a healthy population in northern Sweden. *J Genet*. 2012;91(2):237-40.
115. Volckmar A-L, Bolze F, Jarick I, Knoll N, Scherag A, Reinehr T, et al. Mutation screen in the GWAS derived obesity gene *SH2B1* including functional analyses of detected variants. *BMC Medical Genomics*. 2012;5(1):65.
116. Wang Q, Bing C, Al-Barazanji K, Mossakowaska DE, Wang X-M, McBay DL, et al. Interactions Between Leptin and Hypothalamic Neuropeptide Y Neurons in the Control of Food Intake and Energy Homeostasis in the Rat. *Diabetes*. 1997;46(3):335-41.
117. Wauman J, Zabeau L, Tavernier J. The Leptin Receptor Complex: Heavier Than Expected? *Front Endocrinol*. 2017;8(30).
118. Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, et al. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet*. 2009;41(1):25-34.
119. Xi B, Takeuchi F, Meirhaeghe A, Kato N, Chambers JC, Morris AP, et al. Associations of genetic variants in/near body mass index-associated genes with type 2 diabetes: a systematic meta-analysis. *Clinical Endocrinology*. 2014;81(5):702-10.
120. Xu B, Liu J, Li T, Liu S. Gln223Arg polymorphism in the Caucasian population and Pro1019Pro polymorphism in the Chinese population are risk factors for OSAS: An updated meta-analysis of 1159 subjects. *Rev Port Pneumol*. 2017;23(2):62-70.
121. Xu S, Wan Y, Xu M, Ming J, Xing Y, An F, et al. The association between obstructive sleep apnea and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulm Med*. 2015;15(1):105.
122. Yamada Y, Ando F, Shimokata H. Association of genetic variants of *MAOA* and *SH2B1* with bone mineral density in community-dwelling Japanese women. *Mol Med Rep*. 2008;1:269-74.
123. Yamashita T, Murakami T, Otani S, Kuwajima M, Shima K. Leptin Receptor Signal Transduction: *OBRa* and *OBRb* offaType. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;246(3):752-59.
124. Yang C-W, Li C-I, Liu C-S, Bau D-T, Lin C-H, Lin W-Y, et al. The joint effect of cigarette smoking and polymorphisms on *LRP5*, *LEPR*, near *MC4R* and *SH2B1* genes on metabolic syndrome susceptibility in Taiwan. *Mol Biol Rep*. 2013;40(1):525-33.
125. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day INM. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(17):e88-e88.
126. Ye S, Humphries S, Green F. Allele specific amplification by tetra-primer PCR. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(5):1152-52.
127. Yiannakouris N, Yannakoulia M, Melistas L, Chan JL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(9):4434-9.
128. Young T, Evans L, Finn L, Palta M. Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women. *Sleep*. 1997;20(9):705-6.
129. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med*. 1993;328(17):1230-5.
130. Zambanini RA. The application of Taguchi's method of parameter design to the design of mechanical systems. *Theses and Dissertations*. 1992:131.
131. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.



## 7. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Konya'nın Ereğli ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Konya'da tamamladı. 1997-1999 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar bölümünü bitirdi. Lisans öğrenimini 2005 yılında Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde tamamladı. Yüksek lisans öğrenimine 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında tamamladı. Doktorasına 2009 yılında yine aynı bölümde başladı. 2007 yılından bu yana N.E.Ü. Göğüs Hastalıkları Uyku Laboratuvarında uzman uyku teknisyeni olarak halen çalışmaktadır. 2014 yılında Uyku Bilimleri Derneğinde (UBİDER) kurucu üye olarak yer almış ve başkan yardımcısı olarak halen devam etmektedir. Evli ve 1 çocuk sahibidir. Yabancı dili İngilizcedir.

Serkan KÜÇÇÜKTÜRK

## EĞİTİM

**Doktora:** Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji A.D. (2009 - 2017)

Doktora Tezi: Obezite ile ilişkili SH2B1 gen varyantlarının uyku apnesi ile bağlantı potansiyelinin belirlenmesi

**Yüksek Lisans:** Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji A.D. (2006-2009)

Y.Lisans Tezi: Konya Popülasyonunda İnsan Leptin Reseptör Genindeki Gln223Arg Polimorfizmi İle OSAHS (Obstrüktif Sleep Apnea/Hypoapnea Syndrome) Arasında İlişki Analizi

**Lisans:** Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2000-2005)

Bitirme Tezi: DNA, Mutasyonlar ve Tamir Mekanizmaları

**Önlisans:** Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri M.Y.O., Tıbbi Laboratuvar Bölümü (1997-1999)

**Orta Öğrenim:** Dumlupınar Lisesi (1993-1996), Dumlupınar Ortaokulu (1990-1993)

## **İŞ TECRÜBESİ, MESLEKİ VE AKADEMİK ÜNVANLARI**

- 2013/... Tubitak-1001/ 113E591 nolu projede yardımcı personel, Yüksek Performanslı Bir Otomatik Uyku Evreleme Sisteminin Gerçekleştirilmesi ve Uyku Apnesi İle Kardiyolojik Rahatsızlıklar Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi.
- 2006/2009 Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D., Bilim Uzmanı.
- 2007-2011 S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları A.D. Uyku Laboratuvarı, Uzman Uyku Teknisyeni
- 2008-2012 Renklibay Sürücü Kursu, İlk Yardım dersi Uzman Öğretici
- 1998/1999 S.Ü Sağlık Hizmetleri M.Y.O. Yaz Stajları; S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Biyokimya, Mikrobiyoloji, Hematoloji, Patoloji, Kan Bankası stajları
- 1998-1999 Uzmanlar Tıp Merkezi, Laborant

## **SERTİFİKALAR VE DENEYİMLER**

- Sağlık Bilimleri Alanında Uygulamalı TÜBİTAK Araştırma Proje Önerisi Hazırlama Eğitimi: Konya/2016 25-27 Kasım (2016, N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi, Konya)
- TUTDER (Tüm Uyku Teknisyenleri Derneği)- Uzman Uyku Teknisyen Sertifikası (2011)
- ULTED (Uyku Laboratuvarı Teknisyenleri Derneği) Uzman Uyku Teknisyen Sertifikası (2009)
- ULTED Uyku Teknisyen Sertifikası (2008)
- MEB Bilgisayar Operatörü Sertifikası (1995)
- Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü; PCR Temelli Genetik Analiz Yöntemleri Kursu (15-17 Ekim 2007)
- SÜDAM Günleri-1 Katılım Sertifikası (2009)
- SÜDAM Günleri-2 Katılım Sertifikası (2009)

## **ÜYE OLDUĞU DERNEKLER**

- UBİDER (Uyku Bilimleri Derneği)- Kurucu üye-Başkan Yardımcısı (2014/...) [www.ubider.org](http://www.ubider.org)
- TUTDER (Tüm Uyku Teknisyenleri Derneği) -Yönetim Kurulu üyesi ve Eğitim Sekreteri (2011/2013)
- TUHAD (Tüm Uyku Hastaları Derneği) - Yönetim Kurulu üyesi (2011/2013)
- ULTED Yönetim Kurulu üyesi ve Eğitim Sekreteri (2010)
- ULTED (Uyku Laboratuvarı Teknisyenleri Derneği)- Üye (2008/2013)

## KONFERANS, SEMPOZYUM, KONGRE, PANEL VB. GÖREVLER

UBİDER Uygulamalı polisomnografi ve Uyku Teknolog Kurslarında (2014-2016)

\*İdari, kurs sekreteri, konuşmacı, eğitimci olarak çeşitli görevler almıştır

\*İnteraktif Uyku ve Solunum evrelerinin AASM kurallarına uygun skorlama eğitiminde öğretici

## ULUSAL VE ULUSLARARASI KABUL EDİLEN SÖZLÜ VE POSTER BİLDİRİLERİ

### ULUSLARARASI

Yayımlar

1. The effect of Gln223Arg polymorphism related to BMI and blood pressure in patients with sleep apnea, 2016 ( Hakem değerlendirme sürecinde... IJMR\_152\_16-Indian Journal of Medical Research)
2. Cuce G, Cetinkaya S, Isitez N, **Kuccukturk S**, Sozen M, Kalkan S, ve ark. Effects of curcumin on methyl methanesulfonate damage to mouse kidney. Biotechnic & Histochemistry. 2016;91(2):122-27.
3. Dursun M, Özşen S, Yücelbaş C, Yücelbaş Ş, Tezel G, **Küççüktürk S**, ve ark. A new approach to eliminating EOG artifacts from the sleep EEG signals for the automatic sleep stage classification. Neural Computing and Applications. 2016:1-18. DOI:10.1007/S00521-016-2578-Z
4. Yücelbas C, Yucelbas S, Ozsen S, Tezel G, **Kuccukturk S**, Yosunkaya S. Detection of Sleep Spindles in Sleep EEG by using the PSD Methods. Indian Journal of Science and Technology. 2016;9(25). DOI: 10.17485/ijst/2016/v9i25/96628
5. Yücelbaş C, Yücelbaş Ş, Özşen S, Tezel G, **Küççüktürk S**, Yosunkaya Ş. Automatic detection of sleep spindles with the use of STFT, EMD and DWT methods. Neural Computing and Applications. 2016:1-17.
6. Yucelbas S, Ozsen S, Yucelbas C, Tezel G, **Kuccukturk S**, Yosunkaya S. Effect of EEG Time Domain Features on the Classification of Sleep Stages. Indian Journal of Science and Technology. 2016;9(25). DOI: 10.17485/ijst/2016/v9i25/96630
7. A. Coskun, S. Ozsen, S. Yucelbas, C. Yucelbas, G. Tezel, S. **Kuccukturk, S.** Yosunkaya, Detection of REM in Sleep EOG Signals, 2016. DOI: 10.17485/ijst/2016/v9i25/96631
8. Yücelbaş Ş., Yücelbaş C., Tezel G., Özşen S., **Küççüktürk S.** and Yosunkaya Ş. Pre-determination of OSA degree using morphological features of the ECG signal. Expert Systems with Applications. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eswa.2017.03.049>

## Poster

Sunulan ve Tam metin yayınlanan

1. Seral Özşen CY, Şule Yücelbaş, Gülay Tezel, Şebnem Yosunkaya, **Serkan Küçüktürk**. Elimination of EMG artifacts from EEG signal in sleep staging. Signal Processing and Communication Application Conference (SIU), 2016 24th; 2016: IEEE. DOI: 10.1109/SIU.2016.7495997
2. C. Yücelbaş, S. Özşen, Yücelbaş. Ş, G. Tezel, M. Dursun, Yosunkaya. Ş, **S. Küçüktürk**, Detection of the electrode disconnection in sleep signals, 2015 23rd Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU), IEEE, 2015, pp. 323-326. DOI: 10.1109/SIU.2015.7129824
3. Şule Yücelbaş, Cüneyt Yücelbaş, Seral Özşen, Gülay Tezel, Mehmet Dursun, **Serkan Küçüktürk** and Şebnem Yosunkaya. Effect On The Classification Results of ECG Artifacts in Full Night Sleep EEG. The International Conference On Science, Ecology And Technology I (Iconsete'2015), Vienna, p.296-319, ISBN: 978-605-5583-69-9
4. Cüneyt Yücelbaş, Şule Yücelbaş, Seral Özşen, Gülay Tezel, Mehmet Dursun, **Serkan Küçüktürk** and Şebnem Yosunkaya. Comparison of SFFS and PCA Methods for the Determination of Sleep Spindles in Sleep EEG Signal Using Time Domain Features. The International Conference On Science, Ecology And Technology I (Iconsete'2015), Vienna, p.296-319, ISBN: 978-605-5583-69-9

## Özet Bildiri yayınlanan

1. **Serkan Kuccukturk**, Sebnem Yosunkaya, Hacer Okur, Sennur Demirel, Faruk Özer. Association Analysis of The Gln223arg Polymorphism in The Human Leptin Receptor Gene, And Traits Related To Osas And Blood Pressure. SLEEP 2010 24th Annual Meeting of the Associated Professional Sleep Societies. Submission ID: 791456. Sleep 2010 (33):0033. P.A15-A15. Abstract Supplements. June 5-9. San Antonio, Texas.
2. Sebnem Yosunkaya, **Serkan Kuccukturk**, Hacer Kuzu Okur, Seyit Ali Kayis. Q223R Polimorphysım And Leptin Levels In Patients With Obstructive Sleep Apnea Syndrome. Abstracts of the 4th International Congress of Molecular Medicine.1 May İstanbul, Turkey. In vivo. 2011;25(3):467-576. <http://iv.iarjournals.org/content/25/3/467.short>
3. Sebnem Yosunkaya, **Serkan Kuccukturk**, Hacer Kuzu Okur, Seyit Ali Kayis. Lipid Profile, Central Obesity, Obesity and Gln223Arg Leptin-Receptor Gene Polymorphism in Turkish Men With Obstructive Sleep Apnea Syndrome. Abstracts of the 4th International Congress of Molecular Medicine.1 May İstanbul, Turkey. In vivo. 2011;25(3):467-576. <http://iv.iarjournals.org/content/25/3/467.short>

## ULUSAL

### Sözlü Bildiri

1. **Serkan Küçüktürk**, Şebnem Yosunkaya, Hacer Kuzu Okur, Sennur Demirel. Konya Popülasyonunda İnsan Leptin Reseptör Genindeki Gln223Arg Polimorfizmi İle OSAHS Arasında İlişki Analizi. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, S-22, 28-31 Ekim 2009. Bodrum.

2. Şebnem Yosunkaya, **Serkan Küçüktürk**. Allerjik Rinit Varlığının Obstrüktif Uyku Apne Sendromu Şiddeti Ve Pozitif Havayolu Basıncı Üzerine Etkisi. Uyku Derneği 3. Uyku Bozuklukları Kongresi, S-19, p43. 27-30 Nisan 2012. Kapadokya

### Poster (Ulusal)

1. Yosunkaya Şebnem, **Küçüktürk Serkan**, Çetinkaya Sümeyra, Çınar İlknur. Prader-Willi Sendromu (PWS) Olan Bir Hastada Uykuda Solunum Bozukluklarının Değerlendirilmesi. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science. 2011, Vol 31, No 6. Supplement. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi. S163, 27-30 Ekim 2011. Antalya

2. Leptin Reseptör (LEPR) Genindeki Lys656Asn Polimorfizmi Obstrüktif Uyku Apne/Hipopne Sendrom (OSAHS)'lu Hastalarda Obeziteyle İlişkilidir. Sümeyra Çetinkaya, **Serkan Küçüktürk**, İlknur Çınar, Şebnem Yosunkaya. XII. Metabolik Hastalıklar ve Beslenme Kongresi, 2013, Eskişehir.

3. Nöropeptid Y Genindeki 1128T>C Polimorfizminin Obezite ve Obstrüktif Uyku Apne/Hipopne Sendromu (OSAHS) Üzerine Etkisi. İlknur Çınar, **Serkan Küçüktürk**, Sümeyra Çetinkaya, Şebnem Yosunkaya. XII. Metabolik Hastalıklar ve Beslenme Kongresi, 2013, Eskişehir.

4. OSAHS hastalığı üzerinde LEPR (leptin reseptörü) Pro1019Pro polimorfizminin etkisi. İlknur Çınar, **Serkan Küçüktürk**, Sümeyra Çetinkaya, Şebnem Yosunkaya. XII. Metabolik Hastalıklar ve Beslenme Kongresi, 2013, Eskişehir.

5. Hipoksi İndüklenebilir Faktör-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) Genindeki Pro582Ser Polimorfizminin Obstrüktif Uyku Apne/Hipopne Sendrom (OSAHS)'lu Bireylerde İncelenmesi. Sümeyra Çetinkaya, **Serkan Küçüktürk**, İlknur Çınar, Şebnem Yosunkaya. XII. Metabolik Hastalıklar ve Beslenme Kongresi, 2013, Eskişehir.

6. Obstrüktif Uyku Apne/Hipopne Sendrom (OSAHS)'lu Bireylerde Leptin Reseptör (LEPR) Genindeki Lys109Arg Polimorfizminin Obeziteyle İlişkisi. Sümeyra Çetinkaya, **Serkan Küçüktürk**, İlknur Çınar, Şebnem Yosunkaya, A.Bülent Turhan. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2013, Kuşadası.

7. Obstrüktif Uyku Apne/Hipopne Sendrom (OSAHS)'lu Bireylerde Leptin Reseptör Genine Ait Polimorfizmlerin Haplotip Analizi. İlknur Çınar, Sümeyra Çetinkaya, **Serkan Küçüktürk**, Şebnem Yosunkaya, H. Gül Dursun, A. Bülent Turhan. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2013, Kuşadası.

- Bu çalışmanın amacı Obezite ile ilişkili SH2B1 gen varyantlarının Uyku apnesi ile bağlantısını araştırmaktır.
- Araştırmaya gönüllü olarak katıldığınız takdirde sizden teşhis ve tedavi için rutin olarak alınan kan alma işlemi esnasında laboratuvar materyali olarak 10 ml EDTA'lı tüplere periferik kan alınacaktır. Bu kan alma işlemi uyku laboratuvarı teknisyenleri veya hemşireler tarafından uygulanacaktır. Genelde bu işlemin hiçbir sakıncası yoktur.
- Bu araştırma yaklaşık bir yıl sürecek, bu süre içerisinde ve sonrasında kimliğiniz gizli tutulacaktır, bilgileriniz ve test sonuçları bilimsel yayımlar, sunumlar dışında kesinlikle kullanılmayacaktır.
- Yapılacak çalışma size hiçbir mali yükümlülük getirmeyecektir.
- Çalışmaya yaklaşık 200 kişinin katılması hedeflenmektedir.
- Bu çalışma sonucunda size ya da ailenize bir yarar getirip getirmeyeceğini şimdiden söylemek mümkün değildir ve bu konuda size bir söz veremeyiz.
- Çalışma olumlu sonuçlanırsa genetik çalışmalarımızın hastalıkların moleküler temelini anlamamıza katkıda bulunarak insan sağlığına yarar sağlamasını beklemekteyiz.
- Çalışmaya katılma tamamen isteğe bağlıdır. İstedığınız zaman çalışmaya katılmaktan vazgeçebilirsiniz. Bu durumda sizden almış olduğumuz örnek yok edilecektir.
- Çalışmadan çıktığınız takdirde teşhis ve tedaviniz ile ilgili herhangi bir aksama olmayacaktır ve etkilenmeyecektir.
- Bu formu imzalamadan önce, çalışmayla ilgili sorularınız varsa lütfen sorun. Daha sonra sorunuz olursa Dr. Şebnem YOSUNKAYA' ya sorabilirsiniz.  
( Tel: 0332 223 61 91)

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

Tarih

...../...../.....

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

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin.

Adı soyadı, imzası (varsa telefon/faks no.)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı soyadı, İmzası:

Bilim Uzmanı Biyolog Serkan KÜÇÇÜKTÜRK

Herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun

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

Yrd. Doç. Dr. Şebnem YOSUNKAYA-2236191

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kişinin.

Adı soyadı, İmzası, Görevi